

UNIVERSITÉ DE GENÈVE
Laboratoire de Pharmacie galénique
et de Pharmacognosie
Prof. A. Mirimanoff

FACULTÉ DES SCIENCES
Laboratoire de Microbiologie
et Fermentations
Prof. F. Chodat

Action du couple antiseptique-tensioactif sur quelques microorganismes

Influence des protides et action lytique du laurylsulfate de sodium

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

par

Marie-Thérèse LHOEST

de LIÈGE (Belgique)

Thèse N° 1245

GENÈVE
Imprimerie H. Studer S. A.
1956

UNIVERSITÉ DE GENÈVE
Laboratoire de Pharmacie galénique
et de Pharmacognosie
Prof. A. Mirimanoff

FACULTÉ DES SCIENCES
Laboratoire de Microbiologie
et Fermentations
Prof. F. Chodat

Action du couple antiseptique-tensioactif sur quelques microorganismes

Influence des protides et action lytique du laurylsulfate de sodium

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

par

Marie-Thérèse LHOEST

de LIÈGE (Belgique)

Thèse N° 1245

GENÈVE

Imprimerie H. Studer S. A.

1956



La Faculté des sciences, sur le préavis de M. le Professeur A. MIRIMANOFF, autorise l'impression de la thèse présentée par M^{lle} Marie-Thérèse LHOEST, intitulée : « Action du couple antiseptique — tensioactif sur quelques microorganismes. Influence des protides et action lytique du laurylsulfate de sodium », sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 18 novembre 1955.

*Le Doyen,
E. PAREJAS.*

Thèse N° 1245.

A mes chers parents.

A ma sœur.

Nos remerciements tout particuliers vont en premier lieu à M. le Professeur André MIRIMANOFF, sous la direction de qui cette thèse a été entreprise. Nous lui exprimons toute notre gratitude.

Nous remercions également :

M. le Professeur F. CHODAT qui a bien voulu suivre la partie bactériologique de notre travail et qui nous a aidé de ses judicieux conseils.

M. le Dr E. KELLENBERGER qui nous a apporté le précieux concours du Centre de Microscopie électronique de l'Institut de Physique.

Enfin M^{lle} A. BOLLE D^r ès sc., dont la collaboration nous a été vraiment précieuse.

AVANT-PROPOS

Le présent travail se propose d'étudier l'action du laurylsulfate de sodium associé à différents antiseptiques sur quelques microorganismes (moisissure et bactéries), en présence de protides.

En cours d'expérience, le laurylsulfate de Na a révélé vis-à-vis de certaines bactéries des propriétés inattendues.

D'autre part, une nouvelle catégorie de substances tensioactives, les mouillants ampholytes, ont fait leur apparition sur le marché, également pendant ce travail.

Ces faits nouveaux nous ont incitée à scinder nos recherches en trois parties que nous exposerons en trois chapitres bien distincts :

I. Le premier chapitre correspondant au plan primitivement établi, c'est-à-dire au comportement de l'association antiseptique-mouillant en présence de protides, chapitre intitulé : « L'Ecran protidique ».

II. Le second chapitre, consacré à l'action lytique du laurylsulfate de sodium sur certaines bactéries.

III. Et, le troisième chapitre, plus bref, qui étudie les propriétés des mouillants ampholytes.

Les expériences exposées dans le premier et le troisième chapitre ont été entreprises sous la direction de M. le Professeur A. MIRIMANOFF; celles du second chapitre sous la direction de M. le Professeur F. CHODAT.

Pour plus de clarté, chacun de ces chapitres comporte une introduction et une conclusion.

Pour éviter des répétitions inutiles, ce travail ne comporte donc pas de conclusion générale.

CHAPITRE I

L'ÉCRAN PROTIDIQUE

INTRODUCTION

Le mécanisme de la désinfection et l'appréciation du pouvoir antiseptique des substances chimiques utilisées à cet effet dans la pratique ont fait l'objet d'innombrables publications et, à l'heure actuelle, la littérature montre que les bactériologues sont assez mal informés sur le mode d'action des antiseptiques sur les microorganismes, de même qu'il n'existe pas encore une méthode universelle d'appréciation de l'activité d'un désinfectant.

Parmi les nombreux facteurs qui interviennent dans la pratique, les protides (pus, sang, débris cellulaires, etc.) jouent un rôle particulièrement important et, se trouvant en présence à la fois de l'antiseptique et du germe, ils se comportent comme un véritable écran. Le plus souvent, réagissant avec l'antiseptique, ils affaiblissent l'action de ce dernier.

Par ailleurs, une catégorie de substances dont les utilisations industrielles sont des plus répandues, les tensioactifs anioniques, ont fait également leur apparition dans le domaine de l'antisepsie. Ces substances relativement peu actives utilisées seules, exercent une influence synergétique parfois des plus élevées lorsqu'on les associe à certains antiseptiques.

Sans invoquer ici des considérations théoriques, rappelons que les bactériologues admettent que les antiseptiques agissent, dans la majorité des cas, par interférence sur les enzymes d'origine bactérienne (1) qu'il s'agisse selon Karlström (2) d'enzyme essentiel constitutif ou d'enzyme adaptatif.

On sait, d'autre part, que certains tensioactifs anioniques exercent une action dégradante sur les protides.

Il est donc permis de supposer que l'association du tensioactif et de l'antiseptique se comporte comme un couple dont chacune des branches peut affecter le microorganisme par un processus du même ordre, mais

dont le mécanisme intime peut être différent. Cette hypothèse, formulée volontairement en termes généraux, peut expliquer dans une certaine mesure le phénomène de la synergie.

En outre, cet effet dénaturant des protides propre au tensioactif s'exerce parallèlement sur l'écran protidique auquel nous avons fait allusion.

Ces considérations légitiment notre hypothèse de travail qui est la suivante : si un tensioactif anionique exerce un effet synergétique à l'égard d'un antiseptique, il pourra également, en « consommant » une partie de l'écran protidique, s'opposer à l'inhibition que ce dernier exerce sur l'antiseptique utilisé seul.

En d'autres termes, la question que nous nous posons est la suivante :

« A-t-on avantage à ajouter à un antiseptique un tensioactif tel que le laurylsulfate de sodium en présence de matière organique ? »

* * *

Confrontons cette hypothèse de travail avec quelques faits connus que nous empruntons à la littérature récente.

1. La matière organique diminue l'activité des antiseptiques

Klarman et Wright (3) ont comparé l'effet bactéricide de différents types de désinfectants en présence et en l'absence de matières organiques. Les antiseptiques étudiés étaient moins actifs en présence de protides; cette baisse d'activité est proportionnelle à la concentration d'antiseptique présente. Ainsi, les dérivés d'ammonium quaternaire sont actifs à de si faibles concentrations que l'inactivation par la matière organique d'une partie de ce type d'antiseptique sera proportionnellement plus forte que celle qui se produit pour des antiseptiques à pouvoir bactéricide moins élevé. En effet, (Mc Culloch (4)) le phénol qui est utilisé à de beaucoup plus fortes concentrations que les dérivés d'ammonium quaternaire est peu inactivé par la présence de matière organique.

Hoogerheide (5) constate l'abaissement du pouvoir bactériostatique (Staph. aur.) de différents antiseptiques en présence de sérum. Parmi les antiseptiques étudiés, citons : le chlorure de cétypyridium, l'hexylresorcinol, le phénol, la Na-dibromohydroxymercurefluorescéine, le protéinate d'Ag.

Masset (6) remarque la diminution du pouvoir fungistatique du borate de phénylmercure par adjonction de gélatine au milieu de culture.

La présence de matière organique interfère avec l'action de la majorité des germicides soit :

a) par réaction du protide avec l'antiseptique. Ce qui est le cas des dérivés mercuriels et notamment du borate de phénylmercure.

Cette fixation de l'antiseptique par le protide se marque soit par une *réaction précipitante*, soit par le *blocage des groupes-SH du protide par le mercuriel* (7).

Le désinfectant qui se combine avec le protide est ainsi enlevé de la solution, laquelle devient moins concentrée et, par le fait même, moins active.

b) par *neutralisation de l'antiseptique par l'effet tampon des protéines*.

c) par le rôle de *colloïde protecteur* que jouent les protides vis-à-vis des bactéries.

Ainsi le pouvoir antiseptique d'un agent purement physique, tel que la chaleur, varie selon qu'il y a ou non des protides présents. La stérilisation par la chaleur humide est moins efficace quand les bactéries sont en suspension dans un milieu contenant suffisamment de protéines pour exercer une action protectrice.

d) par *adsorption* des antiseptiques par le protide, surtout si les premiers abaissent fortement la tension superficielle.

2. Exaltation du pouvoir antiseptique par les mouillants anioniques

Gerschenfeld et Perlstein (8) ont constaté l'exaltation du pouvoir bactéricide de dérivés mercuriels, permanganate et hexylresorcinol par l'Aérosol OT (nom commercial du dioctylsulfosuccinate de sodium).

Ordal et Deromedi (9) notent l'augmentation du pouvoir bactéricide de solutions tamponnées de 2-4-dichlorophénol et de 2-4-6 trichlorophénol par le laurylsulfate de sodium et l'Aérosol OT.

Berthet (10) ajoutant de l'Aérosol OT à différents antiseptiques : borate de phénylmercure, merthiolate, mercurochrome, iodure mercurique, hexylrésorcinol, G4 et G11, en exalte ainsi le pouvoir germicide. (Staph. aur.)

Engler (11) travaillant sur différents champignons, voit l'augmentation marquée du pouvoir fongicide et fungistatique de plusieurs antiseptiques (sulfate d'oxyquinoléine, G4 et G11) par adjonction de Duponol C (nom commercial du laurylsulfate de sodium).

3. Interaction des mouillants anioniques et des protides

Cette interaction se marque soit : par précipitation, par formation de complexes ou par dénaturation.

Précipitation : fonction principalement du pH et de la proportion mouillant/protéine. Elle se produit lorsque ces substances portent des charges électriques opposées (12).

La quantité de mouillant ayant réagi pour donner la précipitation est stoechiométriquement proportionnelle au nombre de groupements basiques de la protéine.

Formation de complexes : se produisant même si le mouillant et le protide sont du même signe (13) et dans une large zone de pH.

L'étude de ces complexes s'est faite par électrophorèse, mesure de la viscosité et de la diffusion (14).

Dénaturation : les mouillants anioniques sont d'excellents agents dénaturants des protéines; ceci fut découvert par Anson (15). Des quantités minimales de mouillant sont suffisantes pour arriver au même résultat que l'urée ou la guanidine employées à de plus fortes concentrations. Ceci se traduit par une libération de groupements -SH- et un accroissement de l'asymétrie moléculaire (augmentation de la viscosité). Une étude de la diffraction des rayons X révèle également ce phénomène de dénaturation des protides par les mouillants.

Lundgren (16) a, d'autre part, montré que certains mouillants pouvaient transformer des protides en une forme fibreuse.

De plus, on constate une diminution de la solubilité et de la cristallisabilité d'une protéine après traitement par un tensioactif (12).

Les mouillants dénaturant les protéines, on comprend aisément qu'ils *inactivent les enzymes*.

Ainsi Freeman (17) démontra l'inhibition complète de l'activité enzymatique de l'amylase, lipase et pepsine par un mouillant anionique employé à la faible concentration de 0,01 M et moins.

De même, Wills (18) constate l'inactivation irréversible et complète d'uréase par le dodécylsulfate de sodium.

Ce même tensioactif précipite la pepsine cristallisée à un pH acide et inactive cet enzyme au pH 4 (19).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Le problème que nous nous proposons d'étudier se présente, en fait, de la manière suivante :

Nous ajoutons un tensioactif anionique à un antiseptique en présence d'un protide et comparons le pouvoir cytotatique avant et après adjonction de mouillant.

Nous avons donc 4 éléments en présence :

- tensioactif anionique;
- antiseptique;
- protide;
- microorganisme (sur lequel se fait le test du pouvoir cytotatique).

C'est en faisant varier ces 4 facteurs différents et en comparant les résultats obtenus que nous pourrons arriver à une généralisation valable.

Tensioactif : C'est le seul facteur que nous avons gardé constant. Nous avons utilisé le laurylsulfate de sodium sous sa forme commerciale désignée par Duponol C ⁽¹⁾.

Ce tensioactif, également nommé dodécylsulfate de sodium a été fort utilisé par les chercheurs dans des études sur l'interaction protéine-mouillant (13); de plus, c'est avec ce mouillant, qu'Engler avait obtenu une synergie remarquable par association avec différents antiseptiques (11).

Antiseptiques : Nous avons choisi des substances très différentes tant au point de vue chimique qu'au point de vue de leur mode d'action :

un dérivé mercuriel :	borate de phénylmercure
un dérivé de la quinoléine :	sulfate d'oxyquinoléine
un dérivé du phénol :	hexylrésorcinol
un dérivé du furane :	furacine (ou 5-nitro-2-furaldéhyde-semicarbazone).

Protides : Ces substances que nous avons ajoutées en quantités connues au milieu de culture représentent in vitro l'*écran protidique* existant in vivo et dont nous avons parlé dans l'introduction.

Nous avons utilisé : soit des protides complets, soit des protides partiellement hydrolysés, soit des produits de la dégradation ultime de protides : les acides aminés.

Protides complets : albumine d'œuf, sérum de bœuf et de cheval, lécithine.

Protide partiellement hydrolysé : peptone, gélatine.

Acides aminés : guanidine, cystine, cystéine.

Microorganismes : Les microorganismes que nous avons employés pour tester le pouvoir cytotatique des différentes associations réalisées sont, d'une part, un champignon, d'autre part, deux bactéries.

Champignon : *Aspergillus niger* : moisissure poussant aisément dans un milieu sucré.

Bactérie Gram + : *Staphylococcus aureus* var. Oxford.

Bactérie Gram — : *Escherichia Coli B* sauvage.

Bactéries le plus communément employées pour des expériences du genre de celles que nous entreprenons.

¹ Marque déposé. Dupont, U.S.A.

Milieu de culture : milieux liquides de préférence aux milieux solides pour éviter les phénomènes d'adsorption.

Théoriquement, le milieu de culture n'est là que pour servir au développement du microorganisme et ne devrait pas interférer avec une substance qu'on y ajoute; pratiquement, il arrive qu'il joue lui-même le rôle d'*écran protidique*. C'est un cinquième facteur que l'on peut être amené à considérer selon la composition du milieu.

* * *

Notre étude se divise en deux parties selon le genre de microorganisme faisant l'objet des expériences :

Dans une *1^{re} partie*, nous décrivons les expériences faites sur un *champignon* : l'*Aspergillus niger*.

La *2^e partie* sera consacrée à l'étude des *bactéries*, partie se subdivisant à son tour en :

1^o expériences relatives à une *bactérie Gram +* : *Staphylococcus aureus*.

2^o expériences relatives à une *bactérie Gram —* : *Coli B. sauvage*.

Première Partie

EXPÉRIENCES FAITES SUR UN CHAMPIGNON : ASPERGILLUS NIGER

CONDITIONS D'EXPÉRIENCE

Milieu de culture : Nous avons utilisé le milieu de Jaag de composition suivante :

NaNO ₃	3,0
KH ₂ PO ₄	1,0
KCl	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
Saccharose	50,0
H ₂ O	ad 1000 cc. pH = 4,6 .

Après dissolution des sels dans l'eau, autoclaver 5 minutes la solution qui devient légèrement trouble; filtrer sur papier, puis stériliser 20' à 115°.

Répartir stérilement cette solution sucrée stérile dans des ballons d'Erlenmeyer stériles, en mesurant exactement 10,0 cc. au moyen d'une pipette jaugée.

Réalisation des dilutions d'antiseptiques et de mouillants :

Nous nous sommes toujours arrangés de manière à ce que chaque ballon d'Erlenmeyer contienne exactement 10 cc. de liquide, toutes adjonctions effectuées.

Avant d'introduire la quantité de solution d'antiseptique ou de mouillant pour obtenir la concentration désirée, nous avons supprimé la

quantité correspondante de milieu de culture; nous n'avons jamais supprimé plus de 10 % de milieu de Jaag pour les expériences en absence de protide et plus de 15 % pour les expériences en présence de protide. (Cet appauvrissement du milieu ne nuisant pas à la croissance du champignon.)

Ainsi, pour obtenir un milieu de composition suivante :

sulfate d'oxyquinoléine	1/50.000
et Duponol C	1/40.000

nous avons procédé comme suit.

Nous avons enlevé au moyen d'une pipette graduée stérile 0,45 cc. de bouillon sucré d'un ballon d'Erlenmeyer contenant 10,0 cc. de ce même milieu.

Puis nous avons ajouté :

0,2 cc. d'une solution de sulfate d'oxyquinoléine à 1/1.000
et 0,25 cc. d'une solution de Duponol C à 1/1.000.

Pour réaliser ces mêmes dilutions, mais en présence de peptone 1/500 :

Nous avons enlevé 0,95 cc. de milieu, ajouté les mêmes quantités d'antiseptique et de mouillant, puis 0,5 cc. d'une solution de peptone à 4 %.

Ensemencement :

Se fait au moyen de deux gouttes (compte-gouttes normal) d'une suspension de spores que l'on ajoute aux ballons d'Erlenmeyer contenant les substances à étudier, seules ou associées.

Suspension de spores :

On ensemence au moyen d'un fil de platine une série de tubes à essais contenant du milieu de Jaag incliné, agarisé à 1,5 %.

Après 10 jours de séjour à l'étuve à 28°, le mycélium d'*Aspergillus niger* s'est développé et sa surface est couverte de spores noires. Les tubes sont retirés de l'étuve et « bloqués » au frigo.

Pour l'ensemencement des milieux liquides, on utilise une suspension de spores obtenue en ajoutant 15 cc. d'eau stérile à un de ces tubes; par agitation du tube et frôlement de la surface de la couche de spores au moyen du fil de platine, les spores se détachent et se mettent en suspension dans l'eau.

Il est nécessaire d'employer pour chaque série d'essais une suspension de spores fraîchement obtenue.

Pour avoir des résultats reproductibles, il faut employer, pour tous les essais concernant un même antiseptique, des spores provenant de tubes ayant incubé ensemble dans l'étuve; si tel n'est pas le cas, il faut chaque fois vérifier les limites de toxicité (voir plus loin) tant du mouillant que de l'antiseptique.

Il semble que l'âge des spores (degré de développement dans l'étuve) est plus important que la durée de séjour au frigo de ces spores.

La suspension de spores doit être homogène et ne pas contenir de débris de mycélium dont la présence pourrait fausser les résultats. Des particules solides auraient pour effet de protéger certaines spores de l'effet toxique de l'antiseptique et du mouillant.

Observations :

Nos observations sont d'ordre fungistatique, c'est-à-dire que nous avons noté l'apparition ou non d'un mycélium à la surface du milieu de culture contenu dans les ballons d'Erlenmeyer après un séjour de 10 jours à l'étuve à 28°.

Nous avons effectué au moins deux essais parallèles de chaque dilution réalisée.

Pour chaque série d'essais, nous avons préparé, en outre, des ballons témoins.

Essais témoins :

— Jaagensemencé	=	témoin de croissance
— Jaag nonensemencé	=	» de la stérilité du milieu.
— Jaag + quantité d'eau équivalente au volume maximum de solutions ajoutées.	}	» du pouvoir nutritif suffisant.
— Jaag + protide nonensemencé.		
— Jaag + protideensemencé.	=	» de la stérilité de la solution de protide.
— Jaag + protideensemencé.	=	» de l'atotoxicité du protide.

RÉSULTATS:

Pour les expériences faites sur les champignons, deux antiseptiques différents ont été employés :

A. le Borate de phénylmercure.

B. le Sulfate d'oxyquinoléine.

A. EXPÉRIENCES UTILISANT LE BORATE DE PHENYLMERCURE COMME ANTISEPTIQUE

Lorsque l'on veut étudier un système comportant trois corps en présence, voire en compétition d'action, il s'agit de connaître tout d'abord l'action de chaque corps sur l'un et l'autre de ses partenaires pris isolément.

Nous étudierons donc l'action fungistatique de chaque couple séparément :

- a) Le couple *antiseptique-mouillant* (Borate de phénylmercure¹ -Duponol C).
- b) Le couple *matière protéique-antiseptique* (différents protides-Borate de phénylmercure),
- c) et, enfin, le couple *matière protéique-mouillant* (différents protides-Duponol C).

puis, nous basant sur les données obtenues, nous étudierons l'action sur le champignon du système à trois constituants :

- d) *matières protéique - antiseptique - mouillant* (différents protides, borate de phénylmercure, Duponol C).

a) Action du Borate de Phénylmercure + Duponol C :

Définissons tout d'abord une notion à laquelle nous ferons constamment appel et qui est celle de « *limite fungistatique* » ou « *limite de toxicité* » : c'est la dilution maximum d'une substance, ayant encore un effet cytostatique, une concentration légèrement plus faible de cette substance n'empêchant pas la croissance du micro-organisme.

Après avoir déterminé les limites de toxicité du Borate de Phénylmercure (= BPM) et du Duponol C (= DC), selon les méthodes décrites précédemment et en employant des solutions aqueuses de ces deux produits, nous avons constaté que le *DC exalte le pouvoir fungistatique du BPM*; en effet, l'adjonction de concentrations atoxiques de mouillant à une concentration également atoxique, seule, de BPM, rend le mélange actif contre la croissance du champignon.

Nous avons varié les concentrations mises en présence d'antiseptique, d'une part, et de mouillant, d'autre part, de manière à voir exactement la « balance » de cette synergie; autrement dit, nous avons cherché quelles étaient les concentrations nécessaires de mouillant à ajouter à une quantité minimum d'antiseptique (atoxique seule) pour rendre le mélange actif.

Ces expériences sont résumées dans le tableau N° 1. On voit qu'en ajoutant du Duponol C 1/30M, on peut faire reculer la limite de toxicité du BPM de 1/5MM à 1/100MM. L'exaltation du pouvoir fungistatique est égale à 20.

¹ Marque déposée : Merfen, Zyma S.A., Nyon.

Tableau N° 1. Limites fungistatiques du Borate de Phénylmercure et du Duponol C.

		Concentration en DC							
		O	1/200 MM	1/100 MM	1/50 MM	1/40 MM	1/30 MM	1/20 MM	1/15 MM
Concentration en BPM	O	+	+	+	+	+	+	+	—
	1/100 MM	+	+	+	+	+	—	—	—
	1/50 MM	+	+	+	+	+	—	—	—
	1/30 MM	+	+	+	+	—	—	—	—
	1/20 MM	+	+	+	+	—	—	—	—
	1/10 MM	+	+	—	—	—	—	—	—
	1/5 MM	—	—	—	—	—	—	—	—

Le trait gras encadre la zone de synergie.

+ = croissance d'A. niger.

— = pas de croissance.

$\frac{1}{10}$ MM = 1/10 million.

$\frac{1}{10}$ M = 1/10.000.

b) Action protides + Borate de Phénylmercure :

Protides utilisés : (et produits de dégradation de protides)

albumine d'œuf, gélatine, sérum de bœuf, lécithine, peptone, guanidine, cystine, cystéine.

Toutes ces substances, sauf le sérum, ont été employées à la concentration de 1/500, dans le milieu de Jaag; elles étaient toutes absolument inoffensives vis-à-vis du champignon, elles en favorisaient même la croissance; les tubes témoins (Jaag + *Aspergillus*) montraient un mycélium moins abondant et moins sporifère que ceux qui contenaient un protide. Le sérum de bœuf a été employé à la concentration de 20%.

Données numériques :

Nous avons ajouté des concentrations croissantes de Borate de Phénylmercure à des milieux de culture contenant les différents protides

choisis. Après avoir ensemencé et laissé 10 jours à l'étuve à 28°, nous avons noté les limites de toxicité observées; ces chiffres sont tous groupés dans le tableau N° 2.

Nous dirons qu'il y a « *indifférence* » entre le protide et l'antiseptique si les limites de toxicité de celui-ci sont les mêmes en présence ou en l'absence de protide.

Nous dirons qu'il y a « *antagonisme* » si les concentrations d'antiseptique requises pour exercer une action fungistatique sont plus fortes en présence de protides qu'en son absence.

Nous voyons (tableau N° 2) que la plupart des protides essayés présentent à l'égard du BPM un caractère d'antagonisme net.

Les données numériques suivantes montrent, cependant, que la lécithine, la pepsine et la guanidine ne modifient pas la limite fungistatique de l'antiseptique.

Tableau N° 2 : Limites fungistatiques du Borate de Phenylmercure en présence de différents protides.

Substance ajoutée	Limites du BPM	Conclusion
Gélatine 1/500	1/2 MM	Antagonisme
Sérum 20%	1/30 M	
Albumen Ovi 1/500	1/50 M	
Peptone 1/500	1/500 M	
Cystéine 1/500	1/50 M	
Cystine 1/500	1/500 M	
Lécithine 1/500	1/5 MM	Indifférence
Pepsine 1/500	1/5 MM	
Guanidine 1/500	1/5 MM	

Limites de toxicité de BPM seul = 1/5 MM.

c) Action protide + Duponol C :

Les expériences précédentes ont été refaites, mais en remplaçant cette fois l'antiseptique par le mouillant.

Les limites fungistatiques observées sont consignées dans le tableau N° 3.

Tous les protides essayés montrent un antagonisme net vis-à-vis du Duponol C; les acides aminés : cystine, cystéine et guanidine, sont indifférents.

Le pH du milieu de Jaag additionné de ces différentes substances a été chaque fois vérifié et ajusté, si nécessaire, au pH de 4,6 au moyen de NaOH N.

Tableau N° 3 : Limites fungistatiques du Duponol C en présence de différents protides.

Substance ajoutée	Limites de DC	Conclusion
Gélatine 1/500	1/2 M	Antagonisme
Sérum 20 %	1/200	
Albumen Ovi 1/500	1/M	
Peptone 1/500	1/5 M	
Lécithine 1/500	1/M	
Pepsine 1/500	1/M	
Cystéine 1/500	1/15 M	Indifférence
Cystine 1/500	1/15 M	
Guanidine 1/500	1/15 M	

Limites de toxicité de DC seul = 1/15 M.

d) Action protide + Borate de Phenylmercure + Duponol C :

Connaissant par les essais précédents la limite d'action fungistatique sur *A.niger* des trois couples isolés protide-antiseptique, protide-mouil-

lant, antiseptique-mouillant, il nous suffira d'ajouter à des concentrations d'antiseptique non toxiques en présence de protide, une quantité de mouillant également non toxique pour voir si la présence de celui-ci a modifié suffisamment l'action résultante de l'ensemble pour rendre au système son action fungistatique primitive (perdue par la présence de protides).

Des séries d'essais ont été effectuées en présence de :

- | | |
|----------------|-------|
| 1. Gélatine | 1/500 |
| 2. Gélatine | 1/100 |
| 3. Peptone | 1/500 |
| 4. Albumen Ovi | 1/500 |
| 5. Sérum | 20 % |

1. Essais en présence de gélatine 1/500 :

Nous avons utilisé « gelatina alba Golddruck pulvis ».

La gélatine a été ajoutée aseptiquement au milieu de Jaag stérile et chauffée au bain-marie 5 minutes en agitant jusqu'à dissolution; la solution est immédiatement refroidie pour empêcher toute hydrolyse de la gélatine par l'acidité du milieu (pH = 4,6).

Chaque ballon d'Erlenmeyer a reçu 9,0 cc. de milieu de Jaag gélatinisé à 0,22 % et contient, par conséquent, $\frac{0,22 \times 9}{100} \sim 0,2$ g. de gélatine soit une concentration finale de 1/500 quand le volume est porté à 10,0 cc.

Nous avons ensuite ajouté soit l'antiseptique, soit le mouillant, soit les deux ensemble de manière à ce que le nombre total de cc. ajouté ne dépasse pas 1 cc., puis nous avons complété ad 10,0 cc. avec de l'eau distillée, stérile.

Exemple : BPM 1/5 MM + DC 1/5 M se fait de la manière suivante :

- 9 cc. bouillon de Jaag gélatinisé à 0,22 %
- + 0,2 cc. solution BPM 1/100M
- + 0,2 cc. solution DC 1/100
- + 0,6 cc. H₂O stérile.

Le pH du milieu gélatinisé a été vérifié avant utilisation.

Nous avons également vérifié la stérilité du milieu gélatinisé en laissant plusieurs ballons d'Erlenmeyer 10 jours à 28° sans ensemencement.

Le milieu de Jaag gélatinisé est limpide et légèrement visqueux.

Le tableau N° 4 résume les essais effectués : nous constatons que les limites du BPM passent de 1/5 MM à 1/2 MM (donc consommation =

1,5×) tandis que celles du DC passent de 1/15 M à 1/2 M (donc consommation = 7,5 ×).

L'antagonisme gélatine-DC est plus marqué que l'antagonisme gélatine-BPM.

Tableau N° 4 : Limites fungistatiques du Borate de Phenylmercure et du Duponol C en présence de Gélatine 1/500.

		Concentration en DC					
		O	1/20 M	1/10 M	1/5 M	1/3 M	1/2 M
Concentration en B P M	O	+	+	+	+	+	—
	1/30 MM	+	+	+	+	+	—
	1/20 MM	+	+	+	+	—	—
	1/10 MM	+	+	+	+	—	—
	1/5 MM	+	+	+	—	—	—
	1/3 MM	+	+	—	—	—	—
	1/2 MM	—	—	—	—	—	—

Nous constatons également que la synergie est importante, quoique atténuée.

L'adjonction de DC 1/2 M rend actif le BPM jusqu'à 1/20 MM, c'est-à-dire 10 × sa limite fungistatique lorsqu'il est seul, non-associé à un mouillant, en présence de gélatine 1/500.

Nous avons répété ces essais en augmentant la concentration en gélatine, pour voir si l'antagonisme du protide envers l'antiseptique, d'une part, et le mouillant, d'autre part, était proportionnel à la concentration en protide.

2. Essais en présence de gélatine 1‰ :

Nous avons suivi le même mode opératoire que précédemment.

Nous avons utilisé un milieu de Jaag gélatinisé à 1,11 %. Ce milieu est limpide et très visqueux à 28°; à 15° il est semi-liquide.

Tableau N° 5 : Limites fungistatiques du Borate de Phénylmercure et du Duponol C en présence de Gélatine 1%.

		Concentration en DC						
		O	1/20 M	1/10 M	1/5 M	1/3 M	1/2 M	1/M
Concentration en B P M	O	+	+	+	+	+	+	—
	1/10 MM	+	+	+	+	+	+	—
	1/5 MM	+	+	+	+	+	—	—
	1/3 MM	+	+	+	+	—	—	—
	1/2 MM	+	+	+	—	—	—	—
	1/1 MM	+	+	—	—	—	—	—
	1/500 M	—	—	—	—	—	—	—

Le tableau N° 5 résumant nos essais nous montre que :

- la « consommation » du BPM par la gélatine est proportionnelle à la concentration de celle-ci

En effet : limite du BPM seul : 1/5 MM
 limite du BPM + gélatine 1/500 : 1/2 MM
 limite du BPM + gélatine 1/100 : 1/500 M

- la « consommation » du DC par la gélatine n'est pas proportionnelle à la concentration de celle-ci.

En effet : limite de DC seul : 1/15 M
 limite de DC + gélatine 1/500 : 1/2 M
 limite de DC + gélatine 1/100 : 1/M

- la synergie est la même en présence de gélatine 1 % qu'en présence de gélatine 1/500 (= 10 ×).

3. Essais en présence de peptone 1/500.

Nous avons utilisé «Peptonum siccum»¹, en solution aqueuse stérile 4%, en ajoutant 0,5 cc. de cette solution à chaque Erlenmeyer contenant 9,5 cc. de milieu de Jaag additionné d'antiseptique et de mouillant. (Concentration finale en peptone — 1/500).

La lecture du tableau N° 6 nous permet de remarquer d'emblée que la peptone « consomme » proportionnellement plus de BPM que de DC. En effet, la concentration d'antiseptique nécessaire est $10 \times$ plus forte en présence de peptone, tandis qu'elle n'est que $3 \times$ plus forte pour le mouillant en présence de ce même protide.

La synergie est atténuée par rapport aux essais précédents : elle est égale à 6.

Tableau N° 6 : Limites fungistatiques du Borate de Phénylmercure et du Duponol C en présence de Peptone 1/500.

		Concentration en DC				
		O	1/20 M	1/10 M	1/7 M	1/5 M
Concentration en BPM	O	+	+	+	+	—
	1/5 MM	+	+	+	+	—
	1/3 MM	+	+	+	—	—
	1/2 MM	+	+	+	—	—
	1/1 MM	+	+	—	—	—
	1/500 M	—	—	—	—	—

L'adjonction de peptone au milieu de Jaag favorise considérablement la croissance du champignon; le mycélium est beaucoup plus volumineux et sporifère quand le champignon a poussé sur le milieu Jaag peptoné que lorsqu'il a crû sur le milieu Jaag seul.

¹ Siegfried, S. A. Zofingue.

4. Essais en présence d'« Albumen Ovi » 1500 :

Nous avons utilisé « Albumen Ovi in lamellis »¹.

Le blanc d'œuf coagulant avec la chaleur, nous avons préparé aseptiquement une solution à 4% dont nous avons prélevé 0,5 cc. pour chaque Erlenmeyer servant à nos essais, Erlenmeyer contenant déjà le milieu additionné de l'antiseptique et du mouillant.

Le tableau N° 7 rend compte de ces expériences.

Tableau N° 7 : Limites fungistatiques du Borate de Phénylmercure et du Duponol C en présence d'Albumen Ovi 1/500.

		Concentration en DC					
		O	1/10 M	1/5 M	1/3 M	1/2 M	1/M
Concentration en BPM	O	+	+	+	+	+	—
	1/500 M	+	+	+	+	+	—
	1/400 M	+	+	+	+	—	—
	1/300 M	+	+	+	+	—	—
	1/200 M	+	+	+	—	—	—
	1/100 M	+	+	+	—	—	—
	1/50 M	—	—	—	—	—	—

L'antagonisme entre le BPM et l'Albumen Ovi est très grand puisque la présence du protide nécessite 100 × plus de BPM pour avoir une action fungistatique.

La synergie est ici égale à 8.

Le milieu de Jaag contenant le blanc d'œuf est opalescent; ceci ne gêne en rien l'observation de la croissance du champignon, celle-ci se manifestant par l'apparition d'un mycélium à la surface du liquide et non au sein de celui-ci.

¹ Provenance : Siegfried S.A., Zofingue.

5. Essais en présence de sérum 20% :

Le sérum provient de sang de bœuf prélevé aseptiquement et séparé du caillot après 48 heures de frigo. Puis ce sérum a été inactivé par chauffage à 48° pendant 40 minutes.

Nous avons employé ce sérum à la concentration finale de 20 %, c'est-à-dire que nous avons ajouté 2 cc. de sérum à chaque ballon d'Erlenmeyer contenant 8 cc. de milieu de Jaag additionné d'antiseptique et de mouillant.

Le milieu était suffisamment riche pour la croissance de l'*Aspergillus* car un témoin contenant 2 cc. de sérum, 7 cc. de milieu de Jaag et 1 cc. d'eau stérile, après ensemencement a très bien cultivé.

Nous avons également fait plusieurs témoins stériles pour vérifier la stérilité de notre sérum.

L'antagonisme entre le BPM et le sérum, d'une part, et le DC et le sérum, d'autre part, est extrêmement fort; la présence de protide nécessite $170 \times$ plus de BPM et $75 \times$ plus de DC pour obtenir une action fungistatique.

La synergie est bien diminuée par rapport aux essais précédents; elle est égale à 3,3.

Le tableau N° 8 résume ces expériences.

Tableau N° 8 : Limites fungistatiques du Borate de Phénylmercure et du Duponol C en présence de sérum 20%.

		Concentration en DC				
		O	1/700	1/500	1/300	1/200
Concentration en BPM	O	+	+	+	+	—
	1/200 M	+	+	+	+	—
	1/100 M	+	+	+	—	—
	1/50 M	+	+	—	—	—
	1/30 M	—	—	—	—	—

Notons également que le sérum — de même que la peptone et le blanc d'œuf, mais d'une façon plus spectaculaire — est un facteur de croissance de l'*Aspergillus*. Non seulement celui-ci pousse beaucoup mieux dans les ballons contenant du sérum, mais également plus rapi-

dement. Tous les ballons d'Erlenmeyer contenant du BPM et du DC, ainsi que du sérum, à des concentrations non toxiques, présentaient un mycélium beaucoup plus important que le témoin contenant le milieu Jaag sans antiseptique, ni mouillant.

B. EXPÉRIENCES UTILISANT LE SULFATE D'OXYQUINOLÉINE COMME ANTISEPTIQUE

Nous avons suivi le même schéma que pour l'étude du BPM et avons examiné l'action de chaque couple séparément avant de les associer.

a) *Action Sulfate d'oxyquinoléine et Duponol C.*

Nous avons utilisé l'« Oxychinolinum sulfuricum » Ph.H.V. en solution aqueuse préparée aseptiquement.

Tableau N° 9 : Limites fungistatiques du Sulfate d'oxyquinoléine et du Duponol C.

		Concentration en DC						
		O	1/60 M	1/50 M	1/40 M	1/30 M	1/20 M	1/15 M
Concentration en SO	O	+	+	+	+	+	+	—
	1/800 M	+	+	+	+	+	+	—
	1/600 M	+	+	+	+	+	—	—
	1/400 M	+	+	+	+	—	—	—
	1/200 M	+	+	+	—	—	—	—
	1/100 M	+	+	—	—	—	—	—
	1/50 M	+	+	—	—	—	—	—
	1/40 M	+	+	—	—	—	—	—
	1/30 M	—	—	—	—	—	—	—

Le tableau N° 9 nous montre la « balance » de la synergie SO (= sulfate d'oxyquinoléine), et DC (= Duponol C).

La synergie maximum que l'on puisse établir est égale à 20, exactement la même que celle qui est réalisée entre le borate de phénylmercure et le Duponol C.

b) *Action : Matières protéiques + SO.*

Contrairement à ce qui se passe pour le BPM, qui est inactivé par la plupart des protides par nous essayés, le sulfate d'oxyquinoléine est « indifférent » à ceux-ci, à l'exception de la peptone.

Le tableau N° 10 donne la liste des protides et acides aminés qui ont été expérimentés sur SO en milieu Jaag (le pH a été chaque fois ajusté à 4,6 quand cela a été nécessaire).

Tableau N° 10 : *Action de différents protides et acides aminés sur les limites fungistatiques du sulfate d'oxyquinoléine.*

Substance ajoutée	Résultat
Peptone 1/500	Antagonisme
Gélatine 1/500	} Indifférence
Sérum 20 %	
Albumen Ovi 1/500	
Papaïne 1/5000	
Pepsine 1/500	
Lécithine 1/500	
Arginine 1/500	
Guanidine 1/500	
Méthionine 1/500	

c) *Action Protides + Duponol C.*

Voir tableau N° 3 (page 19).

d) *Action Protides + Sulfate d'oxyquinoléine + Duponol C.*

Il nous a paru intéressant de voir ce qui se passait dans le cas d'un antiseptique non consommé par le protide qu'on lui ajoute, en présence d'un mouillant.

Le protide, ne réagissant pas avec l'antiseptique, consommera-t-il davantage de mouillant ?

La synergie est-elle plus grande que celle observée avec le BPM, par exemple ? De prime abord, il semble que cela devrait être le cas puisqu'il y a davantage d'antiseptique libre en solution.

Nous avons donc effectué des séries d'expériences en ajoutant :

- | | | |
|----------------------|---|-----------------------|
| 1. Peptone 1/500 | } | antagoniste de SO |
| 2. Albumen ovi 1/500 | | « indifférents » à SO |
| 3. Sérum 20% | | |

1. Essais en présence de Peptone 1/500.

En présence de peptone, la limite fungistatique de SO passe de 1/30 M à 1/10 M (voir tableau N° 11), il faut donc trois fois plus d'antiseptique en présence de ce protide. La consommation de l'antiseptique est relativement petite quand on la compare avec celle du BPM dans les mêmes conditions.

La synergie est égale à 20; donc plus forte que dans le cas du BPM. Ceci pourrait s'expliquer du fait du faible antagonisme peptone-SO et peptone-DC, laissant davantage de mouillant et d'antiseptique « libres » pouvant entrer en synergie.

Tableau N° 11 : Limites fungistatiques du sulfate d'oxyquinoléine et du Duponol C en présence de Peptone 1/500.

		Concentration en DC						
		O	1/50 M	1/30 M	1/20 M	1/10 M	1/7 M	1/6 M
Concentration en SO	O	+	+	+	+	+	+	—
	1/300 M	+	+	+	+	+	+	—
	1/200 M	+	+	+	+	+	—	—
	1/100 M	+	+	+	+	+	—	—
	1/50 M	+	+	+	+	—	—	—
	1/30 M	+	+	—	—	—	—	—
	1/20 M	+	+	—	—	—	—	—
	1/10 M	—	—	—	—	—	—	—

2. Essais en présence d'Albumen Ovi 1/500.

Si les limites de SO restent inchangées (voir tableau N° 12), il n'en est pas de même pour celles du Duponol C; il faut 15 × plus de mouillant en présence d'Albumen Ovi qu'en son absence.

La synergie est égale à 10. Elle est donc plus forte que celle qui est observée dans les mêmes conditions pour le BPM. (= 8).

Tableau N° 12 : Limites fungistatiques du sulfate d'oxyquinoléine et du Duponol C en présence d'Albumen Ovi 1/500.

		Concentration en DC				
		O	1/5 M	1/3 M	1/2 M	1/M
Concentration en SO	O	+	+	+	+	—
	1/500 M	+	+	+	+	—
	1/300 M	+	+	+	—	—
	1/200 M	+	+	—	—	—
	1/100 M	+	+	—	—	—
	1/50 M	+	+	—	—	—
	1/30 M	—	—	—	—	—

3. Essais en présence de sérum 20%.

Voir tableau résumé N° 13.

La synergie est égale à 6,5. (Dans le cas du BPM elle était égale à 3,5.)

Tableau N° 13 : Limites fungistatiques du sulfate d'oxyquinoléine et du Duponol C en présence de sérum 20%.

		Concentration en DC					
		O	1/1000	1/700	1/500	1/300	1/200
Concentration en SO	O	+	+	+	+	+	—
	1/300 M	+	+	+	+	+	—
	1/200 M	+	+	+	+	—	—
	1/100 M	+	+	+	+	—	—
	1/50 M	+	+	+	—	—	—
	1/30 M	—	—	—	—	—	—

RÉSUMÉ DES EXPÉRIENCES ET CONCLUSION DE LA PREMIÈRE PARTIE

Le tableau ci-dessous résume l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette première partie consacrée à l'étude de l'action cytostatique de deux antiseptiques (Borate de Phénylmercure et Sulfate d'Oxyquinoléine) en présence de divers protides sur un champignon : l'*Aspergillus niger*. (Environ 1500 expériences.)

Tableau N° 14 : Résumé des expériences faites sur le champignon en présence de protides.

1	2	3	4	5
Antiseptique	Protide ajouté	Action cytostatique limite de l'antiseptique	Action cytostatique limite de l'anti- septique + DC	Exaltation du pouvoir cytostatique
B.P.M.	O	1/5 MM	1/100 MM	20
	Gélatine 1/500	1/2 MM	1/20 MM	10
	Gélatine 1/100	1/500 M	1/5 MM	10
	Peptone 1/500	1/500 M	1/3 MM	6
	Albumen Ovi 1/500	1/50 M	1/400 M	8
	Serum 20 %	1/30 M	1/100 M	3,3
S.O.	O	1/30 M	1/600 M	20
	Peptone 1/500	1/10 M	1/200 M	20
	Albumen Ovi 1/500	1/30 M	1/300 M	10
	Sérum 20 %	1/30 M	1/200 M	6,6

1/1 MM = 1/1 million.

1/1 M = 1/mille.

1/10 M = 1/10.000, etc.

La colonne N° 3 montre l'action inhibitrice de l'« écran protidique » lorsque l'antiseptique est seul. On voit immédiatement que le recul du pouvoir cytostatique dépend soit de la nature du protide, soit de la nature de l'antiseptique et, cela va de soi, de la concentration des corps en présence.

C'est ainsi que le SO n'est guère influencé dans son action fungistatique par les protides tandis que le BPM l'est fortement.

La colonne N° 4 montre que la diminution du pouvoir antiseptique par le protide peut être en partie restituée lorsqu'on ajoute à cet antiseptique une quantité de Duponol C à une concentration non toxique pour le champignon en présence de protide.

Ainsi, le BPM, fungistatique à 1/2 MM en présence de gélatine 1/500 peut être remplacé par une concentration 10 fois plus faible, 1/20 MM, pourvu qu'on l'additionne de Duponol C à 1/3 M. Cette dernière concentration du mouillant n'est, en effet, pas toxique à elle seule en présence de gélatine 1/500.

Les tableaux N° 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12 et 13 dans la première partie indiqueront quelles sont les concentrations non toxiques de DC employées dans les expériences résumées dans la colonne 4, concentrations que nous n'avons pas fait figurer sur le présent tableau pour ne pas le surcharger.

Cette adjonction de DC restitue une synergie des plus appréciables pour le BPM, malgré la « consommation » parfois très forte de ce mercurel par les protides.

Dans le cas très différent du SO, où la « consommation » de l'antiseptique par le protide n'a pratiquement pas lieu, la synergie s'avère généralement plus élevée. Toutefois, et ceci en particulier avec le sérum, la synergie observée, relativement faible, s'explique par le fait que le mouillant lui-même est fortement fixé par le sérum.

Les deux antiseptiques étudiés par nous représentent donc deux types réactionnels à comportement bien différent. Il est permis de supposer que d'autres antiseptiques donneraient des résultats analogues ou intermédiaires.

Quoi qu'il en soit, nous sommes en mesure de penser que l'adjonction à un antiseptique d'un tensioactif anionique tel que le laurylsulfate de sodium (= Duponol C) est généralement utile, soit parce que cette addition permet de compenser, dans une certaine mesure, l'action empêchante du protide sur l'antiseptique (cas du Borate de Phénylmercure et métaux lourds, en général), soit encore parce que, si l'écran protidique ne se manifeste pas, la synergie entre l'antiseptique et le mouillant permet d'avoir recours à une concentration plus faible d'antiseptique. Ceci peut être avantageux en pratique si l'antiseptique est doué de propriétés irritantes pour la peau et les muqueuses.

Ces conclusions ne sont valables que pour le champignon étudié par nous, l'*Aspergillus niger*; il est permis de supposer, en s'appuyant sur les données de la littérature, (Engler, (11)), que ces observations pourraient s'étendre à d'autres champignons, notamment aux dermatophytes.

Deuxième Partie

EXPÉRIENCES FAITES SUR DES BACTÉRIES

Avant d'exposer les résultats des essais effectués sur différentes bactéries, nous décrirons, dans un bref préambule, notre mode opératoire et nos conditions d'expérience.

CONDITIONS D'EXPÉRIENCE :

Milieux de culture :

Nous avons eu recours à 2 milieux de culture :

Milieu Difco B3 : produit se trouvant dans le commerce sous forme de poudre contenant de l'extrait de bœuf et de la peptone. On pèse 8,0 g. de « Difco nutrient Broth B3 », on ajoute 5,0 g. de NaCl, on complète ad 1.000 cc. avec de l'eau distillée et on stérilise 20' à 115° sous une atm.

Le milieu est parfaitement limpide et aucune filtration n'est nécessaire, ce qui rend l'emploi de ce bouillon très commode.

Le pH final est égal à 6,8.

Milieu M 9 : composé de 2 solutions que l'on mélange par la suite :

<i>Solution A :</i>	KH_2PO_4	3,0 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
	NaCl	0,5
	NH_4Cl	1,0
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7,0
	H_2O dist.	900 cc.
<i>Solution B :</i>	Glucose	4,0
	H_2O	100 cc.

Stériliser les deux solutions séparément et mélanger ensuite dans la proportion : 9 A + 1 B.

Le pH final est égal à 7,0.

Souches de bactéries :

Nous avons utilisé :

le *Staphylococcus aureus* var. Oxford¹ et
le *Coli B.* sauvage.¹

Ces bactéries ont été inoculées au moyen d'un fil de platine sur des milieux Difco agarisés à 1 % inclinés, en éprouvettes, mises à développer à l'étuve à 37° pendant 48 h. puis « bloquées » au frigo à 3-4°. Des repiquages ont été ainsi refaits tous les 15 jours.

Culture mère :

Nous avons prélevé des bactéries au moyen d'un fil de platine à partir de souches en milieu agarisé et avonsensemencé des éprouvettes contenant 10 cc. de bouillon liquide (Difco ou M 9, selon les cas); après un séjour de 24 h. à l'étuve, ces éprouvettes constituaient notre culture mère servant à l'inoculation de nos essais.

Mode opératoire :

Nous avons rempli des tubes à essais de 9 cc. de bouillon (mesurés exactement à la pipette); après stérilisation 20' à 115° et refroidissement, nous avons ajouté soit de l'antiseptique, soit du mouillant, soit de l'un et de l'autre de manière à ce que la quantité ne dépasse pas 1 cc. et avons, éventuellement, parfait au volume total de 10 cc. au moyen d'eau distillée stérile.

Ensemencement :

Nous avons inoculé chaque essai en ajoutant 2 gouttes (compte-gouttes normal) de culture mère âgée de 24 heures.

Nous avons également employé comme culture mère des cultures de 24 h. résultant de l'ensemencement de 10 cc. de bouillon par 2 gouttes d'une culture de 24 h. en n'effectuant jamais plus de 6 repiquages.

Observations :

Les tubes ensemencés ont été mis à l'étuve à 37° et observés au bout de 48 h. Après ce laps de temps, les tubes présentant un trouble microbien sont considérés comme positifs et ceux qui sont restés limpides sont considérés comme négatifs.

¹ Souches qui nous ont été obligeamment remises par le Laboratoire de Microbiologie et Fermentations de l'Institut de Botanique générale de l'Université de Genève.

Nos essais sont donc d'ordre bactériostatique.

Pour chaque espèce d'association antiseptique-mouillant différente, il a été fait 3 essais :

dont deux ont été ensemencés,

dont le troisième, non ensemencé, sert de témoin de stérilité, d'une part, et de turbidité éventuelle, d'autre part; un mélange parfaitement limpide lorsqu'il vient d'être fait à 20°, peut se troubler au bout de 48 h. de séjour à l'étuve à 37°.

Des observations au microscope ont été faites périodiquement pour vérifier l'homogénéité des cultures et la contamination éventuelle des essais.

RÉSULTATS

Les expériences ont été faites sur 2 bactéries :

1° Bactérie Gram + : *Staphylococcus aureus* Oxford.

2° Bactérie Gram — : *Escherichia Coli* B sauvage.

1° ESSAIS SUR UNE BACTÉRIE GRAM + : STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Nos essais ont porté sur 4 antiseptiques :

- A. Sulfate d'Oxyquinoléine.
- B. Borate de Phenylmercure.
- C. Hexylresorcinol.
- D. Furacine.

A. Essais avec le Sulfate d'oxyquinoléine.

Milieu : Difco B3.

Solutions : solutions aqueuses de SO préparées aseptiquement.
solutions aqueuses de DC stérilisées 20' 115°.

Mode opératoire : exposé précédemment.

Résultats : L'exaltation du pouvoir bactériostatique de SO par DC est très nette; elle est égale à 5 (donc moins forte qu'envers le champignon où elle était égale à 20).

Limite de SO seul = 1/100 M
Limite de SO+DC = 1/500 M
Limite de DC = 1/5 M.

L'adjonction de SO et DC au milieu ne provoque l'apparition d'aucun trouble; le pH du milieu additionné de ces substances est compris entre 6,6 et 6,8, donc sensiblement le même.

Le tableau N° 15 résume ces essais.

Tableau N° 15 : Limites bactériostatiques du Sulfate d'Oxyquinoléine et du Duponol C vis-à-vis du *Staph. aur.*

		Concentration en DC					
		O	1/50 M	1/30 M	1/20 M	1/10 M	1/5 M
Concentration en B P M	O	+	+	+	+	+	—
	1/1 MM	+	+	+	+	+	—
	1/500 M	+	+	+	+	—	—
	1/400 M	+	+	+	—	—	—
	1/300 M	+	+	+	—	—	—
	1/200 M	+	+	—	—	—	—
	1/100 M	—	—	—	—	—	—

Adjonction de gélatine 1% :

Milieu : Difco gélatinisé 1%, pH ajusté à 6,8.

Résultats : Limites de SO seul = 1/100 M
 Limites de SO + gélatine 1% = 1/100 M.

La gélatine ne réagit donc pas avec SO; l'expérience avec la bactérie à un pH voisin de la neutralité confirme les résultats obtenus avec le champignon à un pH acide.

Nous avons, par conséquent, jugé inutile de faire des essais en associant le DC à SO en présence de gélatine.

B. Essais avec le Borate de Phénylmercure.

Milieu : Difco.

Solutions : B.P.M. solutions préparées aseptiquement.
DC. solutions stérilisées 20' 115°.

Mode opératoire : général.

Résultats : (voir tableau N° 16).

La synergie B.P.M.-DC, existant envers le champignon, se retrouve atténuée avec le Staphylocoque.

L'exaltation du pouvoir bactériostatique est égale à 7.

Tableau N° 16 : Limites bactériostatiques du Borate de phénylmercure et du Duponol C vis-à-vis du *Staph. aur.*

		Concentration en DC					
		O	1/50 M	1/30 M	1/20 M	1/10 M	1/5 M
Concentration en B P M	O	+	+	+	+	+	—
	1/100 MM	+	+	+	+	+	—
	1/70 MM	+	+	+	+	—	—
	1/50 MM	+	+	+	+	—	—
	1/30 MM	+	+	+	—	—	—
	1/20 MM	+	+	—	—	—	—
	1/10 MM	—	—	—	—	—	—

Adjonction de gélatine 1% :

Milieu : Difco gélatinisé à 1,11 %.

La gélatine a été ajoutée au bouillon chaud maintenu au bain-marie jusqu'à dissolution, puis rapidement refroidi sous courant d'eau froide pour éviter l'hydrolyse de la gélatine; le pH du milieu est ajusté à environ 7,0-7,2 par de la NaOH N, puis le bouillon est distribué dans les éprouvettes.

Mode opératoire : Nous avons rempli des éprouvettes de 9,0 cc de milieu gélatinisé, que nous avons stérilisées ensuite 20' à 115°. Chaque éprouvette contient, par conséquent, $\frac{1,11 \times 9}{100} \approx 0,1$ g. de gélatine.

Puis, nous avons ajouté à chaque éprouvette de l'antiseptique et du mouillant et complété, si nécessaire, ad 10 cc. au moyen d'eau distillée stérile.

Solutions : les mêmes que dans les essais précédents.

Résultats : (voir tableau N° 17).

Tableau N° 17 : Limites bactériostatiques du Borate de Phénylmercure et du Duponol C vis-à-vis du *Staph. aur.* en présence de Gélatine 1%.

		Concentration en DC				
		O	1/20 M	1/10 M	1/5 M	1/3 M
Concentration en BPM	O	+	+	+	+	—
	1/10 MM	+	+	+	+	—
	1/7 MM	+	+	+	—	—
	1/5 MM	+	+	—	—	—
	1/3 MM	+	+	—	—	—
	1/2 MM	+	—	—	—	—
	1/1 MM	—	—	—	—	—

Deux faits ressortent de ce tableau :

- antagonisme net entre le B.P.M. et la gélatine et antagonisme proportionnellement moins prononcé entre DC et la gélatine : en effet, les limites de BPM passent de 1/10 MM à 1/1 MM tandis que celles de DC passent de 1/5 M à 1/3 M.
- exaltation du pouvoir bactériostatique égale à 7 n'est pas atténuée par la présence du protide ajouté.

C. Essais avec l'Hexylrésorcinol.

Milieu : Difco.

Solutions : DC : solution stérilisée 20' à 115°.

Hexylrésorcinol : solutions à 1/M, 2/M et 1/10 M préparées aseptiquement dans un mélange stérile d'eau 40 P + glycérine 60 P et conservées à l'abri de la lumière (sinon une coloration rose apparaît).

Le milieu Difco reste limpide après adjonction de l'antiseptique et son pH ne varie pas de façon notable (6,7-6,8).

Nous avons vérifié l'atotoxicité du solvant employé en ensemençant un témoin contenant le milieu de culture + 10% du mélange eau + glycérine.

Résultats : (voir tableau N° 18).

L'hexylrésorcinol montre le phénomène de synergie lorsqu'il est associé au Duponol C.

L'exaltation du pouvoir bactériostatique est égale à 6,5; donc pareille à celle qui se manifeste pour le BPM. (Voir tableau N° 16.)

Tableau N° 18 : Limites bactériostatiques de l'Hexylrésorcinol et du Duponol C vis-à-vis du *Staph. aur.*

		Concentration en DC				
		O	1/30 M	1/20 M	1/10 M	1/5 M
Concentration en Hexylrésorcinol	O	+	+	+	+	—
	1/300 M	+	+	+	+	—
	1/200 M	+	+	+	—	—
	1/100 M	+	+	+	—	—
	1/50 M	+	+	+	—	—
	1/40 M	+	+	—	—	—
	1/30 M	—	—	—	—	—

Nous avons ensuite voulu voir ce qui se passait en présence de protides; nous avons essayé :

la gélatine et
le sérum.

Adjonction de gélatine 1 % :

Milieu : Difco gélatinisé (utilisé lors des essais avec le BPM).

Solutions : les mêmes que dans les essais précédents.

Mode opératoire : le même que lors des essais BPM + gélatine.

Résultats : (voir tableau N° 19).

- faible antagonisme entre l'hexylrésorcinol et la gélatine; la limite de toxicité passe de 1/30 M à 1/20 M.
- la synergie demeure; l'exaltation est égale à 5.

Tableau N° 19 : Limites bactériostatiques de l'Hexylrésorcinol et du Duponol C vis-à-vis du *Staph. aur.* en présence de Gélatine 1 %.

		Concentration en DC				
		O	1/20 M	1/10 M	1/5 M	1/3 M
Concentration en Hexylrésorcinol	O	+	+	+	+	—
	1/200 M	+	+	+	+	—
	1/100 M	+	+	+	—	—
	1/50 M	+	+	+	—	—
	1/40 M	+	+	+	—	—
	1/30 M	+	+	—	—	—
	1/20 M	—	—	—	—	—

Adjonction de sérum 10%

Milieu : Difco.

Solutions : Hexylrésorcinol (voir essais précédents).

DC (voir essais précédents).

Sérum de cheval, sans phénol, aseptique, en ampoule.¹

Mode opératoire : 8 cc. de bouillon Difco sont distribués dans chaque éprouvette; puis on ajoute l'antiseptique et le mouillant, l'eau distillée stérile ad 9 cc., enfin 1 cc. de sérum.

Les tubes sont alors ensemencés et mis à l'étuve.

Pour chaque essai, nous avons préparé 4 éprouvettes, dont 2 ont été ensemencées, et deux gardées comme témoins stériles ou « témoins de turbidité ».

En effet, l'adjonction de sérum provoque l'apparition d'un trouble fin dans toutes les éprouvettes contenant du DC, trouble pouvant parfaitement être pris pour un trouble bactérien.

L'observation à l'œil ne suffit pas ici pour décréter s'il y a eu croissance ou non de la bactérie; nous avons eu recours au néphélomètre de Pulfrich pour mesurer la turbidité du milieu.

Les témoins stériles nous donnent la turbidité réelle du milieu pour telle ou telle association d'antiseptique + DC, une turbidité plus forte des tubes ensemencés correspondants indiquant une croissance microbienne.

Nous avons également vérifié la présence de Staphylocoques au moyen du microscope (non pas seulement la présence, bien entendu, de ces bactéries, puisque les tubes ont été ensemencés, mais la pullulation de celles-ci).

Résultats : (voir tableau N° 20).

¹ Institut sérothérapique à Berne.

Tableau N° 20 : Limites bactériostatiques de l'Hexylrésorcinol et du Duponol C vis-à-vis du Staph. aur. en présence de Sérum 10%.

		Conc. en DC		
		O	1/1000	1/500
Concentration en Hexylrésorcinol	O	+	+	+
	1/50 M	+	+	+
	1/40 M	+	+	—
	1/30 M	+	+	—
	1/20 M	+	+	—
	1/10 M	+	+	—
	1/7 M	—	—	—

— Il y a antagonisme entre le sérum et l'hexylrésorcinol, la présence de sérum nécessitant 4,3 fois plus d'antiseptique pour obtenir une action bactériostatique.

— L'exaltation de l'antiseptique par le DC est égale à 5,7.

Moyenne des valeurs néphélométriques des tubes nonensemencés contenant l'hexylrésorcinol + DC + sérum 10% = 400

Valeur moyenne des tubesensemencés correspondant aux associations :

$$\begin{array}{l}
 \text{Hexylrésorcinol } 1/40 \text{ M} \\
 \quad \gg \quad 1/30 \text{ M} \\
 \quad \gg \quad 1/20 \text{ M} \\
 \quad \gg \quad 1/10 \text{ M}
 \end{array}
 \left. \vphantom{\begin{array}{l} \\ \\ \\ \end{array}} \right\} + \text{DC } 1/500 = 410$$

Valeur moyenne des autres tubesensemencés : (tubes +) = 815

D. Essais avec la Furacine.

Milieu : Difco.

Solutions : Nous avons utilisé la 5 - nitro - 2 - furaldéhyde semicarbazone crist. en solution à 1/M dans un mélange stérile de 2/3 de polyéthylène glycol 200 et 1/3 d'eau (poids).

La solubilité de la furacine dans l'eau est très faible (1 : 4200).

La solution obtenue est jaune, limpide, a la viscosité de la glycérine et est stable.

Résultats : Limites de la furacine 1/50M

Limites de la furacine en présence de sérum 10 % 1/50M

La présence de sérum ne modifiant pas les limites de toxicité de la furacine, nous n'avons pas poursuivi nos essais.

RÉSUMÉ DES EXPÉRIENCES CONCERNANT UNE BACTÉRIE GRAM + : STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Le tableau suivant résume ces expériences

Tableau N° 21 : Exaltation du pouvoir bactériostatique de différents antiseptiques en présence ou non de protides vis-à-vis du Staph. aur.

Antiseptique	Protide ajouté	Action cytostatique limite de l'antiseptique	Action cytostatique limite de l'anti- septique + DC	Exaltation
B.P.M.	O	1/10 MM	1/70 MM	7
	Gélatine 1 %	1/1 MM	1/7 MM	7
Hexyl- résorcinol	O	1/30 M	1/200 M	6,6
	Gélatine 1 %	1/20 M	1/100 M	5
	Sérum 10 %	1/7 M	1/40 M	5,7
SO	O	1/100 M	1/500 M	5

Il ressort de ce tableau résumé qu'en présence de *Staphylococcus aureus*, le phénomène de la synergie entre tensioactif anionique (Duponol C) et antiseptique se manifeste avec les antiseptiques étudiés, soit : borate de phénylmercure (B.P.M.), hexylrésorcinol et sulfate d'oxyquinoléine (SO).

Lorsqu'on ajoute à ces systèmes un protide, deux cas peuvent se présenter :

— ou bien le protide inhibe une partie du pouvoir bactériostatique de l'antiseptique.

(B.P.M., hexylrésorcinol.)

— ou bien le protide ne réagit pas avec l'antiseptique.

(SO, furacine.)

— Le premier cas est précisément celui qui correspond au problème posé par ce travail : « l'écran protidique ».

L'adjonction de tensioactif (Duponol C) rétablit, dans une certaine mesure, le pouvoir bactériostatique de l'antiseptique.

La synergie se manifeste; elle est toutefois moins forte que dans le cas du champignon : *A. niger*, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que les protides du milieu de culture du Staphylocoque fixent partiellement l'antiseptique et le tensioactif, alors que le milieu de culture de l'*Aspergillus*, milieu minéral, exempt de protides, ne réagit ni avec l'antiseptique, ni avec le tensioactif.

On pourrait donc s'attendre à une synergie plus forte s'il était possible d'avoir recours à un milieu minéral; de fait, nos tentatives de cultiver le Staphylocoque dans un tel milieu ont échoué.

De plus, on sait que les mouillants anioniques sont plus actifs à mesure que le pH baisse (20). Ceci pourrait expliquer également le fait que la synergie observée avec le champignon est plus grande que celle observée avec le Staphylocoque.

En effet, le milieu de culture de l'*Aspergillus* a un pH acide (4,6) favorisant ainsi la toxicité du Duponol C.

Le milieu Difco, par contre, a un pH de 6,8, pH neutre où le mouillant est moins actif.

Une toxicité plus faible du mouillant entraîne, cela se conçoit, une diminution de la synergie.

— Dans le deuxième cas, où l'antiseptique ne réagit pas avec les protides, nous n'avons pas procédé à des essais d'associations antiseptique-mouillant-protide, ces essais n'auraient pas eu de sens pour ce travail.

La synergie antiseptique-mouillant est toutefois atténuée par rapport au champignon, vraisemblablement par la réaction entre le mouillant et le milieu de culture.

2° ESSAIS SUR UNE BACTÉRIE GRAM— ESCHERICHIA COLI B SAUVAGE

Nous avons refait les expériences précédentes, mais en utilisant une bactérie Gram — : le Coli B sauvage.

La synergie antiseptique-mouillant, constatée avec le Staphylocoque, bactérie Gram + se retrouvera-t-elle avec une bactérie Gram — ?

Nos essais ont porté sur deux antiseptiques :

- A. Sulfate d'oxyquinoléine.
- B. Borate de Phenylmercure.

A. Essais avec le Sulfate d'oxyquinoléine.

Milieu : Difco.

Solutions : SO et DC, les mêmes que celles utilisées pour les essais avec le Staphylocoque.

Résultats : Le Duponol C à la concentration de 1/500 n'empêche pas la croissance de la bactérie; des concentrations plus fortes en DC provoquent un trouble dans le milieu, rendant difficile, de ce fait, l'observation d'une croissance microbienne.

Nous confirmons ainsi les données de la littérature, selon lesquelles les mouillants anioniques n'exercent pas d'action bactériostatique vis-à-vis des bactéries Gram —. (21)

— L'adjonction de Duponol C au sulfate d'oxyquinoléine n'exalte pas le pouvoir bactériostatique de celui-ci; il n'y a donc pas de synergie.

Le tableau N° 22 résume les expériences faites.

Tableau N° 22 : Limites bactériostatiques du sulfate d'oxyquinoléine et du Duponol C vis-à-vis du Coli B en milieu Difco.

		Conc. en DC		
		O	1/1000	1/500
Conc. en SO	O	+	+	+
	1/20 M	+	+	+
	1/10 M	—	—	—

B. Essais avec le Borate de Phénylmercure.

Milieu : Difco.

Solutions : les mêmes que celles employées pour le Staphylocoque.

Résultats : (voir tableau N° 23).

De même que pour le sulfate d'oxyquinoléine, il n'y a aucune synergie entre le borate de phénylmercure et le Duponol C.

Tableau N° 23 : Limites bactériostatiques du Borate de Phénylmercure et du Duponol C vis-à-vis du Coli B en milieu Difco.

		Conc. en DC		
		O	1/1000	1/500
Conc. en BPM	O	+	+	+
	1/2 MM	+	+	+
	1/1 MM	—	—	—

Adjonction de gélatine 1%.

Milieu : Difco gélatinisé (selon méthode décrite précédemment.)

Résultats : (voir tableau N° 24).

En présence de gélatine, l'adjonction de DC ne modifie pas la limite bactériostatique du BPM

Ce résultat est inattendu, car la gélatine — nous l'avons vu — réagissant séparément avec le BPM et avec le DC, on pourrait supposer que, même en l'absence de synergie, la fixation d'une partie de la gélatine par le tensioactif, diminuerait de ce fait la consommation de l'antiseptique par le protide.

Tout se passe comme s'il y avait compétition entre l'antiseptique et la mouillant vis-à-vis du protide, ce dernier étant fixé de manière préférentielle par l'antiseptique.

Tableau N° 24 : Limites bactériostatiques du Borate de Phénylmercure et du Duponol C

		Conc. en DC		
		O	1/1000	1/500
Conc. en BPM	O	+	+	+
	1/200 M	+	+	+
	1/100 M	—	—	—

REMARQUES :

Importance du milieu de culture pouvant jouer le rôle d'« Ecran protidique »

Pour l'étude des bactéries, nous avons utilisé le milieu Difco composé d'extrait de viande et de peptone donc contenant des protides.

Lorsque nous avons déterminé les limites bactériostatiques des différents antiseptiques et mouillant, nous n'avons donc pas obtenu des *limites absolues*, mais des limites valables pour le milieu précité seulement, les protides contenus dans celui-ci pouvant interférer avec les substances examinées.

Les conditions idéales de travail seraient de pouvoir utiliser, comme c'est le cas pour les champignons, un milieu synthétique minéral, exempt de protides.

Or, le Staphylocoque est très souvent exigeant au point de vue de ses besoins nutritifs et il ne pousse pas dans un milieu dépourvu de protides ou d'acides aminés.

Par contre, le Coli pousse très bien dans différents milieux synthétiques, notamment dans le milieu M 9 (pour composition, voir p. 33).

Le recours à ce milieu exempt de protides nous permettra :

a) de déterminer la limite de toxicité réelle des antiseptiques employés, ainsi que celle du Duponol C;

b) de constater une synergie éventuelle vis-à-vis du Coli, des antiseptiques et du mouillant, ceux-ci n'étant plus entravés dans leur action par la présence des protides du milieu.

a) **Limite de toxicité réelle :**

1. *Des antiseptiques*

Nous avons déterminé les limites de toxicité de la furacine et du borate de phénylmercure en milieu M 9 sur le Coli.

Les tableaux N° 25 et 26 donnent les valeurs comparatives de ces limites dans les 2 milieux différents :

Milieu Difco : contenant des protides,

Milieu M 9 : exempt de protides.

Tableau N° 25 : *Limites bactériostatiques de la Furacine vis-à-vis du Coli B dans les milieux Difco et M 9.*

	Concentration en Furacine					
	1/300 M	1/200 M	1/100 M	1/80 M	1/60 M	1/40 M
Milieu Difco	+	+	+	+	+	—
Milieu M9	+	—	—	—	—	—

Tableau N° 26 : *Limites bactériostatiques du Borate de Phénylmercure vis-à-vis du Coli B dans les milieux Difco et M 9.*

	Concentration en BPM					
	1/10 MM	1/5 MM	1/4 MM	1/3 MM	1/2 MM	1/1 MM
Milieu Difco	+	+	+	+	+	—
Milieu M9	+	—	—	—	—	—

Ces deux antiseptiques sont donc 5 fois moins actifs en milieu Difco qu'en milieu M 9.

Le milieu Difco exerce une action inhibitrice sur ces antiseptiques jouant ainsi le rôle d'un véritable « écran protidique ».

2. Du mouillant Duponol C.

En milieu M 9, la limite de toxicité = 1/500.

En milieu Difco, à la concentration 1/500 le Coli se développe. Il faudrait donc avoir recours à une concentration encore plus élevée, mais irréalisable en pratique vu l'insolubilité du DC dans le milieu. On peut toutefois admettre que le Duponol est au moins 2 fois plus actif en milieu M 9 qu'en milieu Difco.

b) Essais de synergie en milieu M 9 :

On observe, par association du BPM et du DC une synergie très faible (voir Tableau N° 27) qui n'est pas une synergie à proprement parler, mais une addition de toxicité.

Tableau N° 27 : Limites bactériostatiques du Borate de Phénylmercure et du Duponol C vis-à-vis du Coli B en milieu M 9.

		Conc. en DC			
		O	1/2000	1/1000	1/500
Conc. en B.P.M.	O	+	+	+	—
	1/20 MM	+	+	+	—
	1/10 MM	+	+	—	—
	1/5 MM	—	—	—	—

RÉSUMÉ DES EXPÉRIENCES CONCERNANT UNE BACTÉRIE GRAM — : ESCHERICHIA COLI

CONCLUSION GÉNÉRALE

Nous avons vu précédemment que les résultats obtenus sur un champignon (*Aspergillus niger*) et une bactérie Gram + (*Staphylococcus aureus*) étaient qualitativement du même ordre : établissement d'une synergie entre antiseptique et mouillant anionique, restituant ainsi à l'antiseptique une partie de son pouvoir cytostatique diminué par la présence de protide.

Avec une bactérie Gram —, les résultats sont tout différents :

- Le mouillant anionique (Duponol C), utilisé seul, ne manifeste qu'une très faible action bactériostatique vis-à-vis du Coli (concentration limite toxique : 1/500 en milieu minéral).
- On n'observe aucune synergie quel que soit l'antiseptique associé (sulfate d'oxyquinoléine, borate de phénylmercure, furacine), ceci en l'absence de protide ajouté.
- En présence d'un écran protidique (addition de gélatine au milieu), les résultats demeurent inchangés, ce qui est inattendu, car, à défaut d'une synergie proprement dite, on aurait pu s'attendre à une fixation partielle du protide par le tensioactif, d'où une diminution de l'effet inhibiteur du protide sur l'antiseptique, tout au moins dans le cas du BPM.

Tout se passe comme si le protide était fixé de manière préférentielle par l'antiseptique.

On arrive à cette constatation, qu'en présence de protide, l'adjonction d'un mouillant anionique à un antiseptique ne se justifie (et n'est avantageuse au point de vue pratique) que si une synergie a pu être préalablement constatée.

Et pour que la synergie se produise, il faut que le tensioactif anionique que l'on associe à un antiseptique soit doué d'une toxicité propre (11).

En effet, des expériences complémentaires, effectuées par M^{lle} A. Bolle * sur une autre bactérie Gram — (Proteus 4) ont montré :

d'une part, la non-toxicité du Duponol C (concentration 1/500 non-b-statique)

d'autre part, l'absence de synergie antiseptique-mouillant (BPM et DC).

La littérature concernant les tensioactifs, rappelons-le, admet que les mouillants anioniques à un pH neutre, donc physiologique, ne sont toxiques que pour les Gram + et non pour les Gram — (21).

Il est permis de supposer l'absence de synergie antiseptique-mouillant pour d'autres bactéries Gram — et il est probable que ce caractère s'étend à tout le groupe des bactéries Gram —.

En conclusion : on a avantage, en présence de matière organique, à associer à un antiseptique un tensioactif tel que le laurylsulfate de sodium pour empêcher le développement des champignons et des bactéries Gram +.

Par contre, cette association n'est pas avantageuse dans la lutte contre les bactéries Gram —.

* Laboratoire de Pharmacie Galénique. Université, Genève.

CHAPITRE II

ACTION LYTIQUE DE CERTAINES PRÉPARATIONS DE LAURYSULFATE DE SODIUM

1. Introduction.

Il existe de nombreuses méthodes d'appréciation du pouvoir bactériostatique de substances antiseptiques; elles utilisent soit des milieux de culture solides, soit des milieux liquides. Parmi les méthodes utilisant ces derniers milieux, on peut distinguer deux groupes selon le moment où se fait l'inoculation.

1° *Méthodes « ante inoculum »* consistant à ajouter à des tubes à essais contenant un bouillon de culture des concentrations croissantes d'antiseptique, à ensemercer ces tubes au moyen d'une suspension microbienne et, enfin, après un séjour à l'étuve à 37°, à noter l'apparition ou non d'un trouble microbien dans ces séries de tubes.

Une concentration bactériostatique est une concentration d'antiseptique suffisante pour empêcher le développement bactérien, ceci étant indiqué par la limpidité du milieu.

2° *Méthodes « post inoculum »* consistant à ensemercer différents tubes à essais contenant un bouillon de culture que l'on met cultiver à l'étuve; on mesure ensuite l'intensité du trouble au moyen d'un appareil approprié (néphélomètre), on ajoute des concentrations croissantes d'antiseptique; les essais sont remis à l'étuve et on mesure à nouveau le trouble qu'ils présentent.

Une concentration bactériostatique est une concentration suffisante pour stopper la croissance bactérienne et, par conséquent, une concentration pour laquelle l'intensité du trouble microbien est la même avant l'adjonction d'antiseptique qu'après celle-ci.

Dans la première partie de ce travail, nous avons apprécié le pouvoir bactériostatique en utilisant la première méthode. Nous avons ainsi

constaté que le laurylsulfate de Na (sous sa forme commerciale Duponol C) n'empêchait pas la croissance du Coli à la concentration de 1/500. M. E. Stein, ancien collaborateur du laboratoire de Pharmacie Galénique, a voulu vérifier ce fait en utilisant la deuxième méthode.

C'est alors que nous avons été surpris de constater qu'*après adjonction de Duponol C, le trouble de la suspension microbienne, au lieu d'augmenter (ce qui aurait ainsi indiqué la non-toxicité du produit) ou de rester stationnaire (ce qui aurait prouvé un effet bactériostatique) diminuait très fortement.*

C'est ce phénomène particulier de lyse microbienne que nous nous proposons de décrire.

2. Agent de la lyse.

Nous avons utilisé trois produits d'origine différente répondant à la dénomination commune de « laurylsulfate de sodium » :

le « Duponol C », produit Du Pont de Nemours,
un autre venant de la maison Fluka S. A., Saint-Gall,
et le dernier de Siegfried, Zofingue.

Le laurylsulfate de Na s'obtient dans l'industrie par estérification par H_2SO_4 de l'alcool laurique technique, suivie de neutralisation pour obtenir le sel sodique (22). L'alcool laurique résulte de l'hydrogénation des acides gras de l'huile de coco.

Le produit avec lequel nous avons le plus travaillé est le Duponol C ; c'est un mélange de sulfate alkyl de soude consistant principalement en sulfate laurique sodique $CH_3(CH_2)_{10}CH_2OSO_3Na$. Il est dérivé de l'alcool laurique technique qui contient approximativement 61 % de n-dodecanol et 23 % de n-Tetradecanol, le reste étant un mélange d'alcools C_{10} , C_{16} et C_{18} .

Mais, tandis que le Duponol C et le laurylsulfate Fluka montrent des propriétés lytiques égales vis-à-vis du Coli, le laurylsulfate de Na Siegfried, employé pourtant à une concentration 4 fois plus forte, freine la croissance du Coli sans l'arrêter et ne manifeste aucun pouvoir lytique.

Les produits Du Pont de Nemours et Fluka sont plus solubles dans l'eau que le produit Siegfried ; ils donnent des solutions incolores après stérilisation, tandis que le produit Siegfried donne une solution légèrement jaune après chauffage.

En résumé, le produit désigné dans le commerce sous l'appellation « laurylsulfate de Na » n'est pas un produit pur, mais un mélange ; la Pharmacopée américaine fait doser les alcools gras totaux dans le laurylsulfate de Na. Elle admet un minimum de 58 % qui, calculé en lauryl-

sulfate de Na, donne une proportion de 83%. Il ne s'agit pas du dosage du laurylsulfate de Na directement.

Le laurylsulfate pur serait-il responsable de la lyse observée? Une impureté présente dans le produit Siegfried empêcherait-elle l'effet lytique du laurylsulfate pur de se manifester? Ou bien, la lyse serait-elle due à la présence d'une certaine impureté accessoire présente dans les produits Du Pont de Nemours et Fluka et absente dans le produit Siegfried?

Quel est le véritable agent de la lyse?

Nous ne nous sommes pas attachée à la résolution de ce problème, mais nous avons observé le phénomène de la lyse dans différentes conditions pour essayer d'en expliquer le mécanisme.

3. Conditions d'expérience.

A. Types de milieux de culture

— Bouillon de viande peptoné : *Difco* (v. comp. p. 33)

— Milieux synthétiques : *M9* (v. comp. p. 33)

Friedlein de composition suivante :

CINH ₄	1,0
PO ₄ H ₂ K	1,5
PO ₄ HNa ₂	3,5
NaOH	4,0
Acide lactique	9,0
H ₂ O	ad 1000 cc.
+ SO ₄ Mg	0,1 (à mettre en tout dernier lieu).

Ajuster au pH 7,0, filtrer, puis stériliser.

B. Etat immobile ou aéré de la culture.

Nous avons travaillé sur des bactéries en culture immobile, ou aérée.

Culture immobile : méthode employée habituellement dans les laboratoires; les tubes à essais sont laissés dans l'étuve à 37°; lors des mesures au néphélomètre, on a soin de maintenir les cultures à une température voisine de 37° en les conservant dans de l'eau tiède.

Culture aérée : les tubes sont placés dans un bain dont la température est maintenue à 37° par un thermostat.

Un tube de verre recourbé plonge dans chaque éprouvette amenant l'air produit par une soufflerie; le débit d'air de chaque tube est réglable au moyen d'un petit robinet. Les impuretés de l'air sont retenues par passage à travers un tampon d'ouate.

Tout le matériel est évidemment stérilisé avant chaque essai.

C. Concentrations utilisées

Le Duponol C (désigné par l'abréviation DC) a été employé aux concentrations finales de 2‰, 1‰ et à des concentrations inférieures allant jusqu'à 1/5000.

L'adjonction de mouillant ne modifie pas sensiblement le pH du milieu de culture.

Ainsi : Difco témoin — pH 6,8
Difco + DC 1‰ — pH 6,8
Difco + DC 2‰ — pH 6,9

D. Moment d'intervention de l'agent lytique

Le moment où intervient un agent est une question capitale en bactériologie.

Parfois, nous avons ajouté le mouillant avant l'inoculation; cette technique, utile à certains égards, présente, cependant, de sérieux inconvénients : l'agent exerce son action devant des périodes très différentes du développement de la population microbienne : la phase de latence et la phase de multiplication !

D'autres fois, les additions du mouillant furent faites après 3 heures, 6 heures, etc., de culture. Beaucoup plus simples à comprendre sont ces adjonctions précoces ou tardives qui surprennent la population bactérienne à un moment bien précis de son développement.

E. Germes sur lesquels l'action du Duponol C a été éprouvée

Gram — : E. Coli B sauvage

Proteus 4

Pseudomonas fluorescens.

Gram + : Staphylococcus aureus Oxford

B. subtilis — souche Caron.

F. Mesure du trouble

L'inhibition et l'arrêt de la croissance, ainsi que la clarification des troubles dus aux suspensions de bactéries (bactériolyse) ont été mesurés au moyen du néphélomètre de Pulfrich (filtre intercalé : L. 2,38).

4. Résultats.

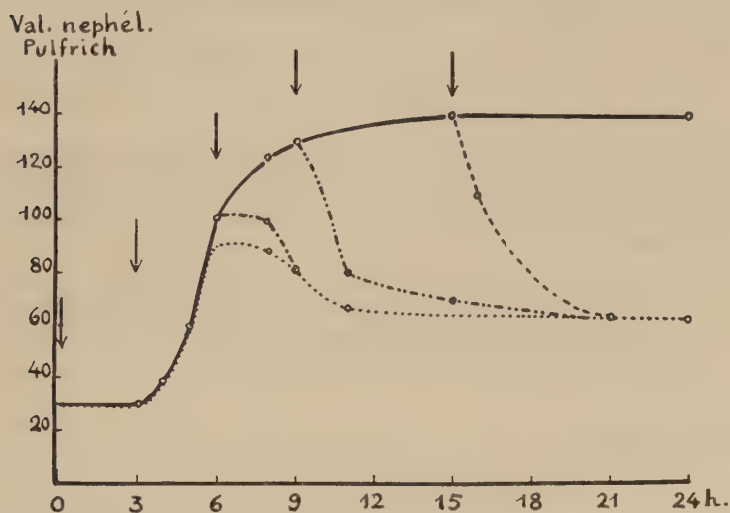
A. Action du Duponol C sur E. Coli B sauvage

Les tableaux N° 28 et N° 29 (valeurs turbidimétriques) figurent les événements que nous avons plusieurs fois observés lorsqu'une culture de E. Coli B sauvage se développe au contact du mouillant (Duponol C)

ou entre en contact avec le mouillant à un moment précis de sa croissance.

a) Action de DC 1⁰/₀₀ en milieu Difco non aéré :

Tableau N° 28 : Valeurs successives néphélométriques présentées par une culture de *E Coli B* sauv. traitée par le Duponol C à la concentration finale de 1⁰/₀₀.



Milieu de culture : Difco liquide non aéré, ni agité.

Trait plein : témoin.

Traits pointillés : expériences.

La flèche indique le moment auquel s'effectue l'addition du mouillant. Pour les deux premières additions, 0 h. et 3 h., (phase de latence), les courbes coïncident; nous n'en avons donc tracé qu'une.

Filtre intercalé dans le néphélomètre de Pulfrich : L. 2,38.

Mouillant ajouté avant l'inoculation ou durant la période de latence, soit 3 h. après l'inoculation :

Dans les deux cas, les résultats sont les mêmes : jusqu'à la 5^e heure de culture, la croissance est, au point de vue du trouble, comparable à celle du témoin. A partir de ce moment, la courbe expérimentale s'écarte progressivement de celle du témoin, forme un plateau entre la 6^e et la 8^e heure, puis redescend (clarification partielle) jusqu'à un palier constant. Un trouble résiduel appréciable persiste.

Mouillant ajouté après la période de latence, soit aux heures suivantes :

6^e heure : La croissance est brusquement interrompue, ce qui se traduit par un plateau de la courbe entre la 6^e et la 8^e heure; la clarification partielle surgit alors et à la 9^e heure la courbe rejoint celle des expériences de 0 et 3 h. Le trouble résiduel persistant a la même importance que celui des expériences précédentes.

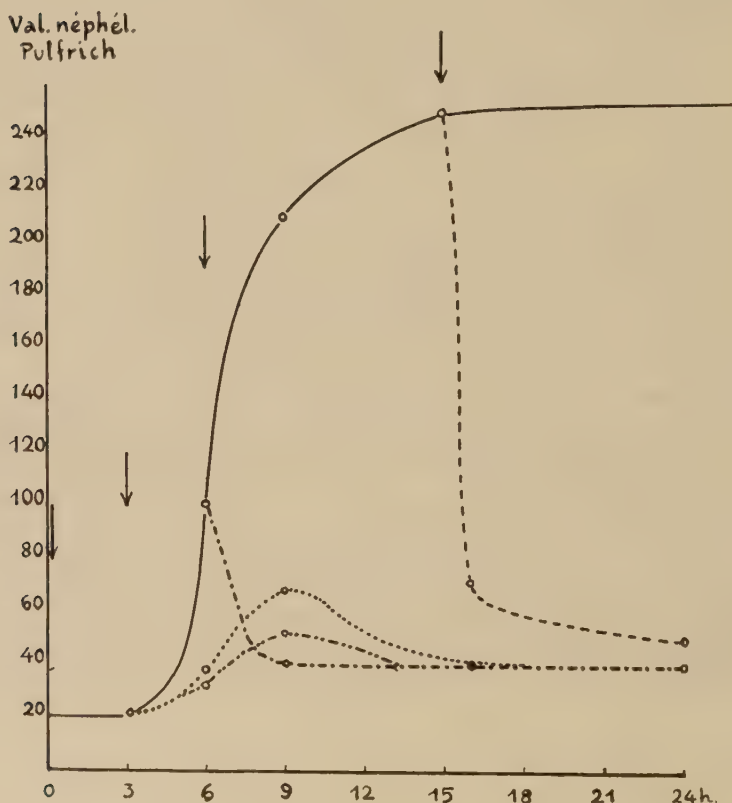
9^e heure : L'addition du mouillant détermine d'emblée une clarification très efficace jusqu'à la 11^e heure, puis ralentie ensuite. A la 21^e heure, le palier correspondant au trouble résiduel des expériences antérieures est atteint.

15^e heure : Même processus qu'à la 9^e heure, mais plus accentué.

b) Action de $DC\ 2\text{‰}_{00}$ en milieu non aéré :

Remarque : Dans le tableau N° 29 ci-après, la croissance du témoin semble plus importante que dans les expériences précédentes. Cette illusion vient du fait que les tubes de ces essais ont été agités avant la mesure turbidimétrique.

Tableau N° 29 : Mêmes systèmes expérimentaux, mais concentration finale du Duponol C : 2‰_{00} . Les tubes à essais, dont les valeurs turbidimétrique sont consignées dans ce tableau, ont été agités avant la lecture, ce qui n'est pas le cas pour les tubes dont les valeurs sont inscrites dans le Tableau N° 28.



A la concentration 2‰, le retard de croissance se marque dès le début de la phase de multiplication, tant pour une addition faite avant l'inoculation que pour une addition faite à la fin de la phase de latence. Les courbes figurant les processus déroulés dans ces deux conditions ne sont plus superposables comme c'était le cas pour la concentration 1‰. En doublant la concentration du mouillant, on se borne, au point de vue turbidimétrique, à accentuer les phénomènes décrits plus haut. La clarification, en particulier, laisse un trouble résiduel de moindre importance.

c) *Action de DC 2‰ en milieu synthétique aéré :*

Nous avons vu dans la première partie de ce travail, qu'un milieu de culture riche en protides, ce qui est notamment le cas du milieu Difco, peut interférer avec le mouillant anionique ajouté et, par conséquent, en diminuer l'efficacité.

Nous avons eu recours au milieu synthétique de Friedlein, milieu dans lequel se développe très bien le Coli en culture aérée.

L'aération, notons-le toutefois, peut être un facteur modificateur direct ou indirect :

- direct : cet apport supplémentaire d'oxygène est susceptible de jouer un rôle dans la lyse (voir plus loin).
- indirect : l'aération, accélérant la croissance, modifie ipso facto les relations de quantité entre mouillant et germe.

Nous avons ajouté à une culture aérée de Coli (milieu Friedlein) 1 cc. d'une solution stérile de Duponol C 1/50, ce qui donne une concentration finale en DC de 2‰. En 15 minutes, cette culture avait retrouvé à peu près sa limpidité initiale.

Trouble de la culture avant adjonction de DC :	560
Trouble de la culture 1/4 h. après adjonction de DC 2‰ :	40
Trouble du milieu de culture avant inoculation :	20

Une adjonction de DC à 1/5000 détermine encore un éclaircissement notable d'une culture de Coli cultivée dans ces mêmes conditions.

Une suspension d'E. Coli B sauvage dans une solution de liquide de Ringer se clarifie rapidement sous l'influence du Duponol C. L'addition de bouillon de viande à de tels systèmes ralentit d'une façon notable la lyse par le mouillant.

En résumé, la sensibilité du Coli B au Duponol C est encore plus grande lorsque la bactérie est cultivée en milieu synthétique aéré de Friedlein.

La méthode de culture aérée ne permet pas de faire des essais en série pour les raisons suivantes :

- Le réglage des robinets d'air ne permet pas une distribution d'air rigoureusement égale dans chaque tube à essais. L'aération joue un rôle et dans la lyse et dans la croissance. Les résultats en fonction du temps ne sont pas les mêmes d'une fois à l'autre.
- La remise en marche de l'aération, dans chaque culture, après la mesure du trouble au néphélomètre prend un certain temps.
- L'adjonction du mouillant au milieu détermine avec l'aération l'apparition d'une mousse abondante qui soulève le tampon d'ouate obturant le tube à essais (laissant ainsi la porte ouverte aux infections et vidant peu à peu l'éprouvette de son contenu).

d) *Trouble résiduel.*

Au fur et à mesure que progresse la bactériolyse (*E. Coli*) sous l'influence du Duponol C, *la viscosité du liquide de culture augmente*. Des glaires peu sédimentables apparaissent alors dans le bouillon de culture. Examinées au microscope et au microscope électronique, ces matières sont constituées de déchets microbiens et de bactéries épargnées par la lyse. Les glaires résultent de la transformation d'une partie du trouble résiduel.

Lorsqu'une lyse restreinte est réalisée par le Duponol C sur des germes *autoclavés* (*E. Coli*), ni l'augmentation de viscosité, ni les glaires ne surgissent. Ces derniers faits prouvent la part jouée par l'autolyse enzymatique dans le processus de bactériolyse déclenché par le mouillant anionique.

e) *Croissance postlytique :*

Environ 24 heures après la clarification, les tubes de culture se troublent de nouveau. La lyse épargne toujours un certain nombre de germes normalement colorables et responsables des multiplications ultérieures. Cette sélection temporaire n'isole pas des cellules dotées d'une sensibilité à la fois moindre au mouillant et transmissible aux « générations » suivantes. Des expériences ont, en effet, montré que des bactéries (*E. Coli*) issues de la repousse (microbes multipliés postérieurement à la lyse au Duponol C) et replacées dans les conditions décrites dans l'expérience de lyse, ont conservé leur sensibilité initiale à l'égard du mouillant.

Des estimations de survie¹, consécutives à un traitement au lauryl-sulfate Fluka opéré sur une culture Difco aérée de 2 h. 30' d'âge évaluent

¹ Mesures dues à l'obligeance de M^{me} E. Kellenberger, du Centre de Microscopie électronique de l'Université de Genève.

le nombre de germes épargnés, nombre variable en fonction de la concentration du mouillant :

Suivie après contact	Concentration 0,4 ‰	Concentration 2 ‰
de 15 minutes	8 ‰	3 ‰
de 30 minutes	10	3
de 60 minutes	25	5,5

L'addition de 1.000 unités/cc. de Pénicilline, faite simultanément à celle de Duponol C 1 ‰, empêche toute repousse sans pour cela augmenter la lyse. Les germes épargnés par le Duponol C sont décimés par la Pénicilline.

En résumé et complément, on peut dire que la propension de E. Coli B sauvage à la lyse par le Duponol C :

- grandit avec la concentration du mouillant,
- est indépendante du pH initial du milieu entre les valeurs 6,1 et 7,4,
- est indépendante du degré d'aération du liquide de culture,
- est meilleure dans un bouillon usagé-filtré (où se sont développées antérieurement les mêmes bactéries) que dans un bouillon frais,
- est apparemment nulle pour des germes durant la phase de latence,
- est grande pour des germes appartenant à une culture âgée (9 à 15 heures),
- est grande pour des germes chauffés 15' à 60°.

f) *Microscopie électronique :*

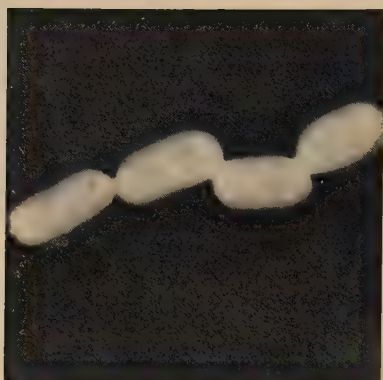
Les photographies ci-après, prises par les soins du Centre de Microscopie électronique de l'Université de Genève, à qui nous adressons nos remerciements, concernent E. Coli B sauvage en voie de lyse sous l'influence du Duponol C et montrent des signes de dégradation cellulaire d'une rare intensité.

Les figures 1 à 4 sont celles de germes de cultures non aérées, les figures 5 et 6 représentent des préparations de cultures aérées.

Figure 1 = témoin.

La figure 2 (1 heure de contact avec le mouillant à 2 ‰) indique une contraction cytoplasmique plasmolyforme.

La figure 3 (2 heures et 2 ‰) révèle l'aspect criblé de la membrane.



1



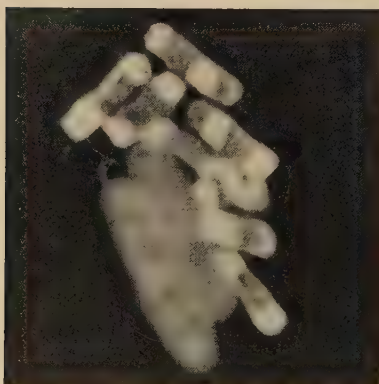
2



3



4



5



6

Photographies prises au microscope électronique du Coli B après traitement par le Duponol C.

Dans la figure 4 (2 heures et 2⁰/₁₀₀) la dissolution de la membrane se manifeste et les déchets microbiens forment une flaque périphérique.

La figure 5 signale l'effet d'une concentration de 0,4⁰/₁₀₀ de Duponol C après 2 heures de contact.

Dans la figure 6 (2 heures et 2⁰/₁₀₀) le cytoplasme en voie de désorganisation accuse un aspect feutré.

Le grossissement du microscope est 5000 ×

B. *Effet du Duponol C sur d'autres bactéries*

Gram — :

Nous avons étendu à deux autres bactéries Gram — soit un *Proteus* 4 et un *Pseudomonas fluorescens* — les traitements imposés à *E. Coli* B sauvage. Ni pour l'un, ni pour l'autre, nous n'avons observé de retard illimité ou simplement prolongé de la multiplication cellulaire. Le Duponol C n'exerce donc pas d'effet bactériostatique. Par contre, les deux germes sont lysés : légèrement dans le cas du *Pseudomonas*, fortement dans celui du *Proteus* qui, à cet égard, révèle une sensibilité supérieure à celle de *E. Coli* B sauvage. La lyse de ces deux nouveaux germes est également accompagnée d'une augmentation de viscosité du liquide de culture.

En conclusion, nous ne pouvons pas souscrire à l'opinion généralement admise que les mouillants anioniques, plus exactement le Duponol C, sont atoxiques pour les bactéries Gram—.

Gram + :

L'examen, dans les mêmes conditions, du comportement de deux bactéries Gram +, un *Staphylococcus aureus* et un *B. subtilis* Caron, fournit de tout autres résultats : le Duponol C exerce une action bactériostatique nette, mais ne détermine aucune bactériolyse.

Cette différence fondamentale entre les microbes Gram + et Gram —, soulignée par l'action du Duponol C, pose à nouveau le problème du mode d'intervention des mouillants anioniques dans l'économie cellulaire.

5. DISCUSSION

Généralités sur la bactériolyse

La bactériolyse est une question qui a beaucoup intéressé les chercheurs surtout ces dernières années du fait, d'une part, de l'amélioration des moyens techniques d'investigation et d'observation (microscope à contraste de phase, microscope électronique) et, d'autre part, de la découverte relativement récente de nouvelles substances ayant le pouvoir de clarifier des suspensions bactériennes (pénicilline (23), lysozyme, etc.).

Les observations qui ont été faites au sujet de la lyse microbienne sont nombreuses, mais il est parfois difficile d'établir un lien entre ces différentes études.

En effet, on peut envisager la bactériolyse sous différents points de vue :

1° *Selon l'origine du principe lytique et sa nature*

On peut considérer :

A : cause externe au germe.

B : cause interne au germe.

A. Cause externe au germe :

a) *de nature enzymatique* : lysines diverses

I. *Bactériolysines* : au sens strict — ant.corps des humeurs animales.

II. *Bactériolysines* : au sens plus large, provenant d'autres microorganismes :

phages

bactéries : ex., Colilysine

champignons : Streptomyces (actinomycétine).

III. *Lysozyme*.

IV. *Ferment digestif* : p. ex. trypsine — que l'on met artificiellement en contact avec des bactéries pour des essais de laboratoire.

b) *de nature non-enzymatique*

Substances chimiques plus ou moins bien définies; principes non issus de cellules vivantes : ex. certaines substances tensioactives.

B. Cause interne au germe :

Les autolysines ne sont rien d'autre que des enzymes constructeurs de la bactérie sortis de l'équilibre du jeu des enzymes par suite de la perturbation de celui-ci.

Quel que soit le cas envisagé, il est toujours difficile de faire le départ entre le rôle de l'agent externe et celui des autolysines dont l'activité sera toujours mobilisée par une agression extérieure.

2° *Au point de vue cytopathologique,*

selon la localisation dans la bactérie même de l'effet lytique.

On distinguera alors des lysines agissant :

a) sur la *capsule cellulaire* — par hydrolyse des polyhosides capsulaires, éliminant ainsi la capsule sans altérer la viabilité cellulaire, p. ex. pneumocoque (24).

- b) sur la *membrane* — ainsi, le lysozyme digère la paroi cellulaire (25), de même que certains dérivés d'ammonium quaternaire (26), libérant ainsi le contenu cellulaire.

Welsch a nommé actinomycétine les principes bactériolytiques sécrétés par un *Streptomyces* (27).

La *nature de la paroi cellulaire* joue un rôle dans cette lyse; les bactéries Gram + et Gram — offrent des résistances inégales.

Si ces résistances jouent un rôle immédiat vis-à-vis des lysines du groupe du lysozyme, il va de soi qu'elles auront aussi, d'une façon moins directe, une répercussion sur les effets des autres catégories de lysines.

- c) sur le *cytoplasme et ses organites*

Cette classification cytopathologique se justifie quand on l'utilise pour mieux connaître la structure microbienne. Elle n'invoque pas d'agents différents de ceux qui sont considérés dans la classification précédente, mais ces agents y sont groupés d'après un autre point de vue.

Enfin, un seul et même germe, p. ex. le *Streptomyces albus* fournit, comme on a pu le montrer, une collection, en partie connue, de principes qui pourraient être placés dans l'une ou l'autre des catégories précédentes (27 et 28).

Les classifications proposées ci-dessus sont grossières mais pratiques. En définitive, d'une façon plus fine, les phénomènes qui relèvent de chacune de ces catégories demeurent liés. Il est impossible de donner une image simplifiée et schématique du phénomène de la bactériolyse. Tout dépend finalement du point de vue auquel se place l'opérateur.

Rattachons nos propres expériences à ce tableau général :

- a) le laurylsulfate de sodium est un agent externe non enzymatique.
b) le phénomène que nous observons touche à une autolyse prématurément déclenchée.
c) ce phénomène dépend de la résistance plus ou moins grande offerte en raison de la nature des membranes.

CRITIQUE ET INTERPRÉTATION DE LA LYSE DUE AU DUPONOL C

Le mécanisme par lequel un mouillant altère la vitalité cellulaire n'est pas encore compris malgré l'abondante documentation expérimentale (29) acquise dans ce domaine. Une réponse unique à la question posée est peu probable : les molécules à propriétés tensioactives sont

diverses, la sensibilité aux mouillants varie avec le type de cellule et les signes de l'altération produite sont nombreux.

La description expérimentale qui précède marque les limites du terrain exploré par nous; les conclusions qui suivent sont valables pour l'ensemble ainsi défini. On peut souhaiter que le principe adopté pour interpréter les faits convienne encore à d'autres systèmes comparables.

Nous envisageons un mécanisme unique d'intervention du mouillant anionique au sein des structures du métabolisme de la cellule. Nous préférons provisoirement cette hypothèse à celle qui attribue à une même molécule une propriété tensioactive et une propriété toxique. L'intervention du mouillant consiste en une dénaturation des protides, telle qu'elle a été décrite par les chimistes (13) et (15) une première réaction où interviennent des affinités électrostatiques, puis une seconde correspondant à la formation d'un complexe protéine-mouillant. L'élément neuf de notre argumentation se ramène à tenir compte de deux types d'appareil protidique : le protide-enzyme et le protide-plastique, séparation peut-être discutable, mais utile à notre analyse. Dans la cellule, la dénaturation se traduit par l'accaparement d'un protide, désormais soustrait au système enzymatique auquel il appartient, et, par le dégagement de protides de l'édifice plastique qu'ils constituaient. Le premier de ces dommages se répercute sur le métabolisme (toxicité), le second sur l'architecture colloïdale (perméabilité).

La force d'affinité d'un mouillant anionique pour un protide varie en fonction du pH régnant dans le milieu ou communiqué au milieu par la composition même du protide. D'autres causes peuvent encore déterminer des différences d'intensité dans l'affinité des deux éléments d'un couple : mouillant-protéine. Ces facteurs conditionnent, en partie, ce qu'on nomme globalement spécificités réactionnelles; nous les invoquons sans pouvoir encore en fournir la mesure *in vivo*.

Utilisons maintenant les propositions précédentes dans le cas des bactéries Gram + et Gram — :

	Protide-enzyme	Protide-plastique
Gram +	1. i	2. I
Gram —	3. i'	4. I

i, i' et I = intensités d'affinité.

Il suffit de reconnaître à certains protides-enzymes des bactéries Gram + une sensibilité au mouillant anionique considéré (exprimée par i) plus grande que celle des protides-enzymes correspondants des bactéries Gram — (valeur i'), pour établir une théorie satisfaisant les exigences des résultats expérimentaux.

En (1) une forte dénaturation des enzymes réduit le métabolisme, provoque en conséquence une bactériostase marquée et fait avorter ipso facto les actes fermentatifs du catabolisme (autolyse).

En (3) une dénaturation moindre des enzymes épargne le métabolisme, en partie tout au moins, et laisse au catabolisme (autolyse) l'occasion de se dérouler.

Il n'est pas nécessaire de supposer des intensités d'affinité dans le couple mouillant-protide plastique, différentes chez les Gram + et les Gram — (valeur I). L'altération des protides plastiques, qui s'institue au contact du mouillant, ne devient manifeste qu'avec le concours des enzymes protéolytiques ou, tout au moins, qu'en raison du flot des protides digérés qui filtre avec moins de peine à travers le réseau relâché de la trame colloïdale. Ajoutons à ce propos que le cortex de ribo-nucléate calcico-magnésien des bactéries Gram + oppose un important écran au passage vers l'extérieur des produits qui auraient pu se liquéfier à l'intérieur du germe. On sait par des travaux antérieurs que la « négativation » du Gram (30) précède toujours l'autolyse microbienne.

Notre interprétation de la bactériolyse par le Duponol C fait appel au mécanisme de digestion endocellulaire dont l'activité est prématurément déclenchée chez les microbes Gram —. Cette autolyse anticipée n'est elle-même qu'une conséquence d'une perturbation de l'équilibre des systèmes compétitifs d'enzymes de la dégradation et d'enzymes de la synthèse. Le mouillant doit altérer ces derniers par le mécanisme sus-décrit, pour que les diastases de l'autolyse manifestent si tôt et si fort leur activité naturelle.

Le rôle fermentatif joué par la cellule dans la lyse déclenchée par le mouillant nous est prouvé par les faits suivants : un chauffage de 15' à 120° rend *E. coli* B sauvage beaucoup moins susceptible d'être lysé par le Duponol C. L'altération définitive des enzymes autolytiques n'est toutefois pas obtenue par un simple autoclavage, de la suspension microbienne.

Notre explication évite enfin l'emploi des notions de charges électriques respectives du mouillant et de la surface microbienne, notions où la théorie et les données expérimentales se contredisent constamment.

A l'hypothèse d'une sensibilité au mouillant anionique inégale des protides enzymes de germes Gram —, et des protides enzymes de germes Gram +, on peut substituer et même préférer l'hypothèse suivante :

- les bactéries Gram — contiennent des substances glucido-lipidiques nommées « antigènes de Boivin et Mesrobéanu ». La copule liposoluble de cet antigène est constituée principalement par des matières phospho-lipidiques (31).

L'abondance de ces dernières dans les corps bactériens Gram — est peut-être à l'origine du comportement distinct du Duponol C chez les Gram + et les Gram —. On sait, en effet, que les mouillants anioniques forment des complexes avec les substances lipidiques (19). Ces dernières, en bloquant totalement ou en partie le Duponol C, protégeraient les enzymes de son action dénaturante.

CHAPITRE III

TENSIOACTIFS ET ANTISEPTIQUES OBSERVATIONS SUR UN SAVON AMPHOLYTE, LA DODECYL-DI (AMINOETHYL) GLYCINE

Introduction.

On sait que les détergents de synthèse appelés encore mouillants, ou substances tensioactives, termes mal choisis car pas toujours synonymes, sont généralement classés en trois catégories : anioniques, cationiques et non-ioniques.

Tandis que les deux premières se dissocient dans l'eau, l'anion et respectivement le cation formant la partie active de la molécule, les substances non-ioniques, le plus souvent des esters, ne se dissocient pas.

Une quatrième catégorie de corps tensioactifs, beaucoup moins connue, quoique déjà décrite dans la littérature en 1949 (32), n'a fait que récemment son apparition dans la pratique. Il s'agit des détergents amphotères, également désignés sous le nom de savons ampholytes. Par définition, ces corps possèdent simultanément une fonction acide et une fonction basique; les acides aminés, en particulier, possèdent trois possibilités de dissociation grâce à leur propriété de former des zwitterions, les conditions de pH permettant de favoriser soit la formation de cations ou d'anions.

Dans une publication récente, Schmitz (33) définit clairement, au moyen de schémas, le comportement d'acides aminés contenant une molécule lipophile conférant à ces amphotères un caractère supplémentaire de substance tensioactive.

Toutefois ces tensioactifs amphotères n'auraient conservé qu'un intérêt purement théorique si Schmitz et ses collaborateurs n'avaient réussi à synthétiser une série de dérivés possédant à la fois un pouvoir détersif très élevé et une activité antiseptique remarquable.

En outre, certains de ces corps réagissent relativement peu avec les protides, ce qui semble leur conférer un avantage sur les tensioactifs

cationiques. Enfin, leur innocuité sur la cellule animale permet d'envisager leur emploi dans le domaine des denrées alimentaires.

Ayant dans des recherches précédentes fait des essais d'association d'antiseptiques et mouillants, il nous a paru intéressant d'étudier le comportement de cette nouvelle catégorie de tensioactifs.

Le présent chapitre rend compte de nos observations.

Rappelons que les tensioactifs non-ioniques eux-mêmes atoxiques pour les bactéries et les moisissures, dont ils favorisent souvent le développement, inhibent parfois l'action des antiseptiques ou révèlent un comportement indifférent.

Les substances cationiques — bien connues par leurs propriétés antiseptiques — ajoutent en général leur action à celle des antiseptiques associés, pourvu que cette addition ne présente pas d'incompatibilité chimique (savons, substances anioniques ou trop acides, etc).

Enfin, les mouillants anioniques et en particulier le laurylsulfate de sodium (produit commercial : Duponol C) possèdent souvent la remarquable propriété d'exalter la puissance de l'antiseptique associé, cette synergie se manifestant surtout avec divers champignons et dans une moindre mesure avec les bactéries Gram +, alors que les bactéries Gram — ne sont pas atteintes par cette association. (Voir chapitre I.)

Toutefois, le laurylsulfate de sodium est lui-même influencé par les protides (sérum par exemple), propriété qui a du reste été mise à profit par les biologistes pour purifier certains enzymes ou même pour mettre en évidence les « noyaux » bactériens par traitement des frottis. (34)

La comparaison entre ce détersif anionique et un savon ampholyte s'imposait d'autant plus que la substance à laquelle nous avons eu recours pour le présent travail comporte également, comme élément lipophile tensioactif, le radical dodécyle. Plaçons l'une sous l'autre les formules de nos deux détersifs :

$C_{12} H_{25} O SO_3 Na$ = Laurylsulfate de Na

$C_{12} H_{25} \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOH \cdot HCl$ =
dodécyl-di (aminoéthyl) -glycine chlorhydrate = D.A.G. par
abréviation.

Cette seconde substance contient dans sa molécule un acide aminocarbonique, formule qui s'est révélée la plus active.

Elle se présente sous l'aspect d'une masse jaune, hydrosoluble, ayant une consistance voisine de celle de la vaseline.

Le pH des solutions, dans l'eau distillée, mesurée par nous au pH mètre s'élève à :

7,0 pour une concentration de 1/10 mille.

7,75 pour une concentration de 1/1000.

8,0 pour une concentration de 1/100.

Remarquons que les solutions aqueuses concentrées sont limpides de 10% à 1/2000; elles deviennent opalescentes à 1/5000 pour s'éclaircir à nouveau au delà de 1/10.000.

Partie expérimentale.

Dans cette recherche restreinte, nous nous sommes proposé d'étudier les points suivants :

1. Action cytostatique, en milieu liquide, du D.A.G. utilisé seul sur une moisissure, *Aspergillus niger*, une bactérie Gram +, *Staph. aureus* et une bactérie Gram —, *E. Coli*, comparativement au laurylsulfate de Na.
2. Le comportement du D.A.G. en présence de protides (sérum) comparativement à d'autres tensioactifs.
3. Le D.A.G. exerce-t-il une action synergétique sur un antiseptique déterminé?
4. Toxicité du D.A.G. sur la cellule d'un végétal supérieur.

1. Action cytostatique du D.A.G. en milieu liquide.

a) *Aspergillus niger*

Milieu utilisé : minéral (Jaag).

Dans des ballons d'Erlenmeyer de 50 cm³ contenant 10 cm³ de milieu de Jaag, on ajoute des quantités croissantes de D.A.G., de façon à réaliser des dilutions de ce produit de 1/100.000 à 1/5.000. Puis, selon la technique habituelle¹ on ajoute 2 gouttes d'une suspension homogène de spores d'*Aspergillus niger* âgées de 10 jours. On place à l'étuve à 27° C. Le témoin ne contient pas de D.A.G. et on vérifie que son pH (4,8) ne soit pas sensiblement modifié par l'addition du tensioactif. On observe les cultures (2 ballons au minimum par essai) pendant 15 jours.

Résultat : La quantité cytostatique minimum de D.A.G. pour *A. niger* correspond à la dilution 1/5 mille. A la concentration de 1/8 mille, le champignon se développe, quoique ralenti dans sa croissance.

Le laurylsulfate de Na (Duponol C) est cytostatique à 1/15.000.

Un tensioactif cationique (le Désogène Geigy) est cytostatique à 1/30.000.

Contrairement à notre attente, le D.A.G. peut être considéré, pour cette moisissure, comme un fungistatique plutôt faible.

¹ (Voir Chapitre I, page 13.)

b) *Staphylocoque* (*S. aureus* Oxford).

Milieu utilisé : Difco (Bacto nutrient broth) qui est un extrait de viande peptoné.

Même technique de dilutions, mais en éprouvettes de 20 cm³ contenant 10 cm³ de bouillon.

Ensemencement : 2 gouttes d'une culture de 24 heures.

t = 37°C.

Durée des observations : 72 heures.

Limite cytostatique : 1/40 mille.

Comparaison avec d'autres mouillants :

Désogène : 1/200 mille (à partir de la substance solide)

Duponol C : 1/5 mille.

Le D.A.G. se révèle très supérieur au Duponol C; il est cependant moins actif que le Désogène comme agent bactériostatique.

c) *Escherichia Coli* (Coli B sauvage, USA)

Milieu utilisé : Difco.

Même technique de dilutions et d'ensemencement que ci-dessus (b).

t = 37° C.

Durée : 72 heures.

Limite cytostatique : 1/20 mille.

Comparaison avec d'autres mouillants :

Désogène : 1/200 mille.

Duponol C : n'empêche pas la croissance même à 1/500.

Le DAG est moins bactériostatique que le Désogène; il se révèle toxique vis-à-vis du Coli, contrairement au Duponol C.

2. *Comportement du D.A.G. en présence de protides*
(sérum)

Le sérum (bœuf) provient de sang prélevé aseptiquement et désactivé par chauffage à 58° pendant 40 minutes.

Nous avons observé au préalable le comportement du D.A.G. en présence de sérum.

Avec 5% de sérum en solution aqueuse stérile, des concentrations de D.A.G. variant de 1/10 mille à 1/2 mille ne provoquent pas de précipitation, même après 3 jours. En revanche, un trouble suivi d'un dépôt se produit dans le milieu minéral de Jaag. Ce trouble ne nuit cependant pas à l'observation du développement mycélien.

Consignons les résultats, limités à *A. niger*, sous forme de tableau.

Tableau N° 30 : Action du sérum sur les limites fungistatiques de différents types de mouillant.

Tensio-actif		Limite toxicité	Limite toxicité avec sérum à 5 %	Abaissement de toxicité
Ampholyte —	D.A.G.	1/5 M	1/3 M	1,7
Cationique —	Désogène . . .	1/30 M	1/7 M	4,3
Anionique {	Duponol C . .	1/20 M	1/ M	20
	AOT	1/5 M	1/250	20
	Santomerse . .	1/3 M	1/100	30

Ces résultats montrent qu'avec *A. niger*, la présence de sérum influence beaucoup moins l'action antiseptique du D.A.G. que ce n'est le cas pour les autres mouillants. A remarquer combien le Duponol C, relativement toxique pour la moisissure, perd ainsi de son activité.

Le Désogène, malgré une fixation importante de la part de sérum, demeure cependant la substance la plus fortement fungistatique, dans ces conditions opératoires tout au moins.

3. *Le D.A.G. exerce-t-il une action synergétique en association avec un antiseptique ?*

Ce problème est des plus intéressants, au double point de vue théorique et pratique. On pouvait se demander si la présence du radical alcoyle $C_{12}H_{25}$ dont l'activité dans les mouillants anioniques a été démontrée (11), commune aux deux molécules, impose ou non une synergie.

a) *Aspergillus niger*.

Le tableau suivant résume nos expériences, limitées à l'addition de sulfate d'oxyquinoléine (S.O.) étudié précédemment par nous-mêmes, et se prêtant particulièrement bien à ce genre d'expérience.

Il ressort immédiatement de nos résultats que la zone de synergie — encadrée d'un trait gras — est des plus faibles, pour ne pas dire négligeable. Le pH ne peut être incriminé, car il est semblable à celui qui est observé en présence de Duponol C dont la synergie dans ce cas est au moins 10 fois plus élevée. L'influence supposée du groupe alcoyle $C_{12}H_{25}$ est donc annulée par la partie amino-carbonique de la molécule de D.A.G.

Tableau N° 31 : Action combinée du sulfate d'oxyquinoléine et du D.A.G. sur *Aspergillus niger*.

		Concentration en DAG					
		O	1/30 M	1/20 M	1/10 M	1/8 M	1/5 M
Concentration en SO	O	+	+	+	+	+	—
	1/70 M	+	+	+	+	+	—
	1/50 M	+	+	+	+	—	—
	1/40 M	+	+	—	—	—	—
	1/30 M	—	—	—	—	—	—

b) *S. aureus*.

Aucune synergie ne se manifeste.

c) *Coli B*.

Aucune synergie.

Conclusion : Le D.A.G. incapable de provoquer une synergie dans le cas des 3 microorganismes étudiés, ne fait qu'ajouter sa toxicité propre à celle de l'antiseptique, ce qui le rapproche des mouillants cationiques.

Le Duponol C exerce une synergie extraordinairement élevée avec *Aspergillus*, marquée avec *S. aureus* et nulle avec le *Coli B*.

4. Toxicité du D.A.G. sur la cellule d'un végétal supérieur

Un précédent travail (35) montrait que la toxicité des mouillants variait, avant tout, avec la nature de la cellule végétale (champignon, algue, bactérie, végétal supérieur), en particulier pour les mouillants anioniques; les dérivés non-ioniques se montrent toujours atoxiques tandis que les tensioactifs cationiques exercent une action léthale très marquée.

Avec *Elodea canadensis*, dont l'observation est particulièrement aisée, nous avons comparé l'effet du D.A.G. et du Duponol C, en ajou-

tant ces substances en concentrations variées à de l'eau de fontaine placée dans des cristallisoirs contenant un rameau du végétal.

Le contrôle de toxicité est effectué en observant les mouvements cytoplasmiques et la plasmolyse (saccharose 0,8 molaire).

Le résultat de cette étude peut s'exprimer comme suit : dans nos conditions opératoires, le D.A.G. peut être considéré comme $10\times$ plus toxique que le Duponol C (à temps égal, une concentration décuple de Duponol C est nécessaire pour tuer les cellules), et légèrement moins toxique que le Désogène.

Conclusion : Dans le cas d'un végétal supérieur, la toxicité du D.A.G. s'apparente à celle des tensioactifs cationiques comme dans le cas des bactéries étudiées, et contrairement à ce qui se passe avec *A. niger*.

Discussion.

Ce troisième chapitre se proposait d'étudier l'action cytostatique d'un nouveau savon tensioactif de synthèse appartenant aux savons ampholytes, en la comparant à celle de mouillants anioniques et cationiques déjà connus.

Ce nouveau dérivé, le dodécyl-di (aminoethyl) glycine chlorhydrate ¹ possède un pouvoir bactériostatique très marqué sur le *Staph. aureus* et le *Coli B.*, qui permet de le rapprocher de celui des mouillants cationiques; il est, à cet égard, beaucoup plus actif que les mouillants anioniques, surtout vis-à-vis du *Coli*.

Plus faiblement fungistatique que le Duponol C (nom commercial du laurylsulfate de sodium) avec *A. niger*, il ne provoque, associé à un antiseptique (sulfate d'oxyquinoléine) aucun phénomène de synergie, contrairement à ce qui se passe avec plusieurs mouillants anioniques.

Nous avons confirmé que ce savon ampholyte réagit beaucoup moins avec les protides (sérum) que les mouillants anioniques ou cationiques.

Si cette dernière propriété explique vraisemblablement son innocuité observée par d'autres auteurs vis-à-vis de la cellule animale, et permet, par comparaison avec le Duponol C, de comprendre pourquoi la synergie avec un antiseptique s'établit dans le cas de ce mouillant anionique et ne se manifeste pas avec un savon ampholyte, il devient plus difficile d'expliquer la toxicité antibactérienne propre à ces nouveaux dérivés.

Peut-être se produit-il, dans la cellule, une réaction enzymatique transformant la molécule $R-NHCH_2-COOH$ (atoxique) en $R-NH_2$, l'amine s'avérant beaucoup plus toxique que le dérivé aminocarbonique.

Ce processus expliquerait peut-être aussi pourquoi la dose léthale serait proche, pour ces dérivés, de la dose bactériostatique.

¹ Principe actif du produit commercial « Tego ».

CONCLUSION GÉNÉRALE

En raison du caractère bien distinct des trois chapitres constituant ce travail, cette thèse ne comporte pas de résumé général.

Le lecteur trouvera aux pages 49, 63 et 73 les conclusions de chacun de ces trois chapitres.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. SYKES, G. *Journ. of Pharmacy and Pharmacology* 1955, 561-579.
2. KARSTRÖM, quoted by Gale. *The chemical activities of Bacteria*. Univ. Tutorial Press London (1947).
3. KLARMAN, E. G. et WRIGHT, E. S. *Soap* 20, 103-105 (1944).
4. MC CULLOCH, E. C. *Disinfection and sterilization* Lea et Febiger. Philadelphia.
5. HOOGERHEIDE, J. C. *Journ. of Bacteriol.*, 49, 277-289 (1945).
6. MASSET, J. L. Thèse N° 1066, Genève (1944).
7. BOLLE, A. et MIRIMANOFF, A. Ph. *Acta Helv.*, 24, 85-95 (1949).
8. GERSCHENFELD, L. et PERLSTEIN D. *Am. J. Pharm.*, 113, 237-255 (1941) et *Pharm. International*, 3 (1949).
9. ORDAL, E. J. et DEROMEDI, F. *Journ. Bact.*, 45, 293-299.
10. BERTHET, R. Thèse N° 1132, Genève (1949).
11. ENGLER, V. Thèse N° 1149, Genève (1950).
12. PUTNAM, F. W. et NEURATH, H. (1944), *J. Am. Chem. Soc.* 66, 692-697.
13. PUTNAM, F. W. et NEURATH, H. (1945). *J. Biol. Chem.*, 159, 195.
14. NEURATH, H. et PUTNAM, F. W. *J. Biol. Chem.*, 160, 397-408 (1945).
15. ANSON, M. L. (1939). *J. Gen. Physiol.* 23, 239.
16. LUNDGREN, H. P. (1949). *Advances in protein Chemistry*, vol. V.
17. FREEMAN, S., BURRIL, M. W. et IVY, A. C. (1945). *Gastroenterology*, 4, 332-343.
18. WILLS, E. D. (1954). *Biochem. J.* 57, 109-120.
19. PUTNAM, F. W. *Advances in Protein Chemistry*. Vol. IV.
20. GLASSMAN, H. N. *Bact. Rev.* (1948), 12, 105-148.
21. ORDAL, E. J. et BORG, A. F. (1942). *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 50, 332-336.
22. KOPACEWSKI, W. (1953) « Les détersifs en pharmacie ». Masson Ed.
23. JANOT, M. M. et KEUFER, J. (1953), « Mécanismes biochimiques de l'activité des antibiotiques ». Masson Ed.
24. PIRIE, N. W. Introduction « The Nature of the Bacterial Surface » (1949), Symposium of the Soc. of Gen. Microbiology. Ed. Blackwell, Oxf.
25. SALTON. Rapport du 3^e Congrès international de Biochimie (1955).
26. SALTON, J. *Gen. Microbiology*, (1951), 5, 391-405.
27. WELSCH, M., *J. Bact.* (1942), 44, p. 571.
28. WELSCH, M. *Revue belge Path. méd. exper.* (1947), 18, supp. 2.
29. MITCHELL, P. « The Osmotic Barrier in Bacteria » (id. à 24).
30. STACEY, M. « The Nature of the Surface of Gram + Bacteria (id. à 24).
31. BOIVIN, A. et DELAUNAY, A. (1947), « Organismes en lutte contre les microbes », Gallimard Ed.
32. SCHWARZ, A. M. et PERRY, J. W. *Surface active agents*, New York, 1949.
33. SCHMITZ, A. *Amphotere oberflächenaktive Stoffe als Wasch- und Desinfektions-Mittel Fette und Seife*, 55, 10-16 (1953).
34. DELMOTTE, N. C. R. *Soc. Biol.* 147, 173 (1953).
35. MIRIMANOFF, A. *Bull. Féd. Intern. Pharm.* N° 3 (1949).

TABLE DES MATIÈRES

	<i>Pages</i>
AVANT-PROPOS	5
CHAPITRE I. — L'ÉCRAN PROTIDIQUE	
Introduction	7
Partie expérimentale	10
<i>1^{re} Partie : Expériences sur un champignon Aspergillus niger</i>	13
Conditions d'expérience	13
Résultats	15
A. Expériences avec le Borate de Phénylmercure	16
B. Expériences avec le Sulfate d'Oxyquinoléine	26
Résumé des expériences et conclusions de la 1 ^{re} Partie	30
<i>2^e Partie : Expériences sur des bactéries</i>	33
Conditions d'expérience	33
Résultats	35
1 ^o <i>Expériences sur Bactérie Gram + : Staphylococcus aureus.</i>	35
A. Essais avec le Sulfate d'Oxyquinoléine	35
B. Essais avec le Borate de Phénylmercure	37
C. Essais avec l'Hexylrésorcinol	39
D. Essais avec la Furacine	43
Résumé des expériences concernant Bactérie Gram +	43
2 ^o <i>Expériences sur Bactérie Gram — : Coli B.</i>	45
A. Essais avec le Sulfate d'Oxyquinoléine	45
B. Essais avec le Borate de Phénylmercure	46
<i>Remarques : Importance du milieu de culture pouvant jouer le rôle d'écran protidique</i>	47
Résumé des expériences concernant Bactérie Gram —	49
Conclusion générale	49

CHAPITRE II. — ACTION LYTIQUE DE CERTAINES PRÉPARATIONS DE LAURYSULFATE DE SODIUM	51
1. Introduction	51
2. Agent de la lyse	52
3. Conditions d'expérience	53
4. Résultats	54
A. Action du Duponol C sur E. Coli B sauvage	54
B. Effet du Duponol C sur d'autres bactéries	61
5. Discussion	61
Généralités sur la bactériolyse	61
Critique et interprétation de la lyse due au Duponol C.	63
 CHAPITRE III. — TENSIOACTIFS ET ANTISEPTIQUES. QUELQUES OBSERVATIONS SUR UN SAVON AMPHOLYTE, LA DODÉCYLDI (AMINOETHYL) GLYCINE	 67
Introduction	67
Partie expérimentale	69
1. Action cytostatique du D.A.G. en milieu liquide	69
2. Comportement du D.A.G. en présence de protides (sérum)	70
3. Le D.A.G. exerce-t-il une action synergétique en association avec un antiseptique	71
4. Toxicité du D.A.G. sur la cellule d'un végétal supérieur	72
Discussion	73
CONCLUSION GÉNÉRALE.	74
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	75

